

# Visualisierung und Charakterisierung der molekularen Anordnung von Annexin A2 auf Lipidmembranen

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV - Chemie und Pharmazie -

der Universität Regensburg



vorgelegt von

MANUELA MENKE

aus Georgsmarienhütte

2005



Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 2001 bis Mai 2005 unter der Leitung von Prof. Dr. C. Steinem am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie – der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht im Juni 2005.

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2005

1. Prüfer:	Prof. Dr. C. Steinem
2. Prüfer:	Prof. Dr. A. Göpferich
3. Prüfer:	Prof. Dr. W. Kunz
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. M. Liefländer





*Meiner Familie*



**Abstract.** Annexins are a family of structurally related proteins that reversibly bind to membranes containing anionic phospholipids in a calcium-dependent manner. Annexin A2 is special among the family as it can exist in two different physiological states, as annexin A2 monomer and as a heterotetrameric complex, which consists of two annexin A2 molecules connected via their N-terminal region by a p11 (S100A10) dimer. The heterotetramer, which is the predominant form in cells, is bound to the plasma membrane and early endosomes, whereas monomeric A2 is localized in the cytosol. Though the distinct function of annexin A2 is still unknown, its capability of aggregating chromaffin granules and phospholipid vesicles was unambiguously shown indicating its role in endocytosis. The molecular organization of the junctions between membrane surfaces linked by the annexin A2t complex is still a matter of debate. Two different models have been proposed which differ in their molecular arrangements leading to two different height profiles of protein bound to a lipid membrane. The aim of this study was to investigate the molecular arrangement of the protein on the membrane surface. By a detailed height analysis of topographical images of bound annexin A2 obtained by scanning force microscopy, one of the two models could be clearly favored. Experiments have shown that the complex (A2p11)<sub>2</sub> is capable of clustering detergent resistant membranes in the presence of Ca<sup>2+</sup>-ions, which have led to the hypothesis that annexin A2 is able to laterally organize membrane lipids. In this study Ca<sup>2+</sup>-titration experiments of annexin A2m-membrane binding performed by quartz crystal microbalance (QCM) indicated a significant difference in the lateral organization ability of monomeric compared to heterotetrameric annexin A2. By means of scanning force and fluorescence microscopy of artificial membrane systems immobilized on mica surfaces, the lateral organization of bound annexin A2 to lipid bilayers and its influence on the lateral organization of the lipids within the membrane induced by protein binding was visualized. The influence of cholesterol on the lateral annexin A2t surface distribution was described. In this regard cholesterol was shown to retard the indentation of annexin molecules observed on fluid model membranes. Furthermore this investigation suggested the inability of the p11 ligand to interact with membrane bound annexin A2 indicating a regulatory role of p11 for annexin membrane recruitment.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>13</b>
1.1	Struktureller Aufbau der Annexine . . . . .	14
1.1.1	Allgemeine Struktureigenschaften . . . . .	14
1.1.2	Interaktion von Annexin A2 mit S100A10 (p11) . . . . .	16
1.2	Biochemische Eigenschaften des Annexin A2 . . . . .	18
1.2.1	Calcium-abhängige Membranbindung . . . . .	18
1.2.2	Calcium-unabhängige Membranbindung . . . . .	19
1.2.3	Annexin A2 als RNA-bindendes Protein . . . . .	19
1.3	Funktionen des Annexin A2 <i>in vivo</i> . . . . .	20
1.3.1	Annexin A2 vermittelte Endo- und Exocytose . . . . .	21
1.3.2	Annexin A2-Actin-Wechselwirkungen . . . . .	22
1.3.3	Membran-organisierende Eigenschaften des Annexin A2 . . . . .	23
1.3.4	Beteiligung des Annexin A2 bei Krankheiten . . . . .	25
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>29</b>
3.1	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	29
3.1.1	Isolierung von Annexin (A2/S100A10) <sub>2</sub> aus Schweinemucosa . . . . .	29
3.1.2	Trennung des Heterotetramerkomplexes in seine Untereinheiten . . . . .	32
3.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	33
3.1.4	Proteinkonzentrationsbestimmung . . . . .	35
3.1.5	Proteinlabeling mit Fluoreszenzfarbstoff . . . . .	35
3.1.6	Vesikelpelletierungsassays . . . . .	36

3.2	Biophysikalische Methoden . . . . .	37
3.2.1	Filmwaagetechnik . . . . .	37
3.2.2	Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	40
3.2.3	Quarzmikrowaage - Technik . . . . .	42
3.2.4	Rasterkraftmikroskopie . . . . .	45
3.3	Membranpräparation . . . . .	55
3.3.1	Langmuir-Blodgett Technik . . . . .	55
3.3.2	Vesikelspreitmethode . . . . .	57
3.3.3	Mikrostrukturierte Membranen . . . . .	58
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>61</b>
4.1	Isolierung und Modifizierung der Proteine . . . . .	61
4.1.1	Isolierung des Annexin (A2/S100A10) <sub>2</sub> . . . . .	61
4.1.2	Spaltung des Annexin A2t in seine Untereinheiten . . . . .	64
4.1.3	Charakterisierung und Funktionskontrolle der fluoreszenz- markierten Proteine . . . . .	67
4.1.4	Diskussion . . . . .	70
4.2	Molekulare Anordnung des Annexin A2 . . . . .	72
4.2.1	Charakterisierung der verwendeten Lipidschichten . . . . .	73
4.2.2	Membranbindung des heterotetrameren Komplexes . . . . .	75
4.2.3	Membranbindung des monomeren Annexin A2 . . . . .	77
4.2.4	Diskussion . . . . .	82
4.3	Laterale Organisation des Annexin A2 . . . . .	87
4.3.1	Reversibilität der Annexin A2m - Membranbindung . . . . .	88
4.3.2	Visualisierung der Annexin - Bindung mittels Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	96
4.3.3	Visualisierung der Annexin - Bindung mittels Rasterkraft- mikroskopie . . . . .	102
4.3.4	Einfluß von Cholesterin . . . . .	114
4.3.5	Einfluß der p11 - Wechselwirkungen mit membrangebunde- nem Annexin A2m . . . . .	117
4.3.6	Diskussion . . . . .	123

---

<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>139</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>141</b>
<b>Anhang</b>	<b>161</b>
A1 Abkürzungsverzeichnis . . . . .	161
A2 Symbolverzeichnis . . . . .	162
A3 Materialien . . . . .	163
A4 Geräte . . . . .	163





# 1 Einleitung

Annexine sind periphere Membranproteine, deren charakteristische Gemeinsamkeit in der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Bindung an negativ geladene Phospholipide liegt. Die ähnlichen biochemischen Eigenschaften resultieren aus einer strukturell hochkonservierten C-terminalen Domäne, in der die Calcium- und Membranbindungsstellen lokalisiert sind. Bevor die strukturelle Ähnlichkeit und damit die Zusammengehörigkeit zu einer Familie bekannt war, waren die Annexine unter verschiedensten Namen bekannt, die je nach ihrer Entdeckung bezüglich ihrer biochemischen Eigenschaften gewählt waren. Beispiele hierfür sind Synexin (Granulaeaggregierend), Calpactin ( $\text{Ca}^{2+}$ -, Phospholipid- und Actin-bindend) oder Lipocortin (Lipaseinhibitoren). 1990 wurde von Crumpton und Dedman eine einheitliche Nomenklatur vorgeschlagen<sup>[1]</sup>. Der Name Annexin stammt von dem griechischen Wort „annex“, was soviel bedeutet wie „verbinden“ oder „zusammenbringen“, und leitet sich von der gemeinsamen Eigenschaft ab, Membranen zu binden und teilweise zu verknüpfen. Innerhalb der Annexin-Familie unterscheidet man je nach Organismus zwischen Annexin A für Wirbeltiere, B für Wirbeltiere ohne humane Analoga, C für Pilze und Schwämme, D für Pflanzen und E für Protozoen. Allein in Wirbeltieren wurden 12 Annexine (Annexin A1 bis 11 und 13) mit unterschiedlichen *splice*-Varianten gefunden. Die menschlichen Annexin-Gene variieren in ihrer Größe zwischen 15 kb (Annexin A9) und 96 kb (Annexin A10) und sind weit über das Genom verteilt<sup>[2]</sup>. In den meisten Zellarten wird mehr als ein Annexintyp exprimiert, was trotz ihrer strukturellen und biochemischen Ähnlichkeiten auf unterschiedliche Funktionen schließen läßt.

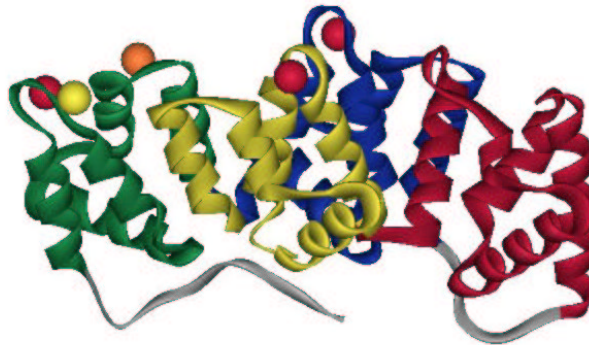
Über die genaue Funktion der Annexine ist noch wenig bekannt, jedoch haben zahlreiche Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Einblicke in die Eigenschaften der Proteine gegeben. Die Lokalisation an frühen Endosomen und die Fähigkeit Membranen zu aggregieren, läßt eine Funktion in  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen endo- und exocytotischen Prozessen vermuten<sup>[3,4]</sup>. Neben den Membran-Membran-Interaktionen sind einige Annexine ebenfalls in der Lage, Membran-Cytoskelett-Wechselwirkungen zu stabilisieren. Außerdem wird aufgrund der Ionenkanalaktivität von z.B. Annexin A5 und A2 eine Beteiligung an der Regulierung von Ionenströmen über die Membran vermutet.

## 1.1 Struktureller Aufbau der Annexine

### 1.1.1 Allgemeine Struktureigenschaften

Die gemeinsamen Membranbindungseigenschaften der Annexine resultieren aus einer großen strukturellen Ähnlichkeit der C-terminalen Region, die als Kerndomäne (Annexin-Core) bezeichnet wird. Von den Kerndomänen der meisten Vertebraten-Annexine sind mittlerweile Kristallstrukturen verfügbar<sup>[5-8]</sup>. Trotz einer Aminosäuresequenzübereinstimmung von nur ca. 45-55 %, weisen ihre Sekundär- und Tertiärstruktur große Homologie auf<sup>[9,10]</sup>. Diese Kerndomäne besteht aus vier sich wiederholenden Einheiten, den sog. Annexin-Repeats, wovon jede ca. 70 Aminosäuren lang ist. Jede dieser vier Domänen besteht aus fünf  $\alpha$ -Helices (A-E), die über kurze Loops miteinander verbunden und in einer rechtsgängigen Superhelix angeordnet sind (Abb. 1.1)<sup>[11]</sup>. Innerhalb eines jeden Annexin-Repeats gibt es einen besonders hoch konservierten Bereich von etwa 17 Aminosäuren, den sogenannten Endonexin-fold. Dieser Bereich zeichnet sich durch das nach Geisow benannte Motiv GXGTDE aus, welches an der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Interaktion der Annexine mit Phospholipiden beteiligt ist<sup>[12,13]</sup>. Eine Ausnahme dieser Strukturbeschreibung ist Annexin A6, das acht anstelle der vier sich wiederholenden Einheiten aufweist. Die dreidimensionale Form der Kerndomäne ähnelt einer gekrümmten Scheibe. An ihrer konvexen Seite befinden sich

die  $\text{Ca}^{2+}$ - und Phospholipid-Bindungsstellen, während sich an der konkaven Seite der N-Terminus anschließt.



**Abb. 1.1:** Kristallstruktur des Annexin-Cores von humanem Annexin A5 (Protein-datenbank-Nummer: 1 avr). Die vier Annexin-Repeats mit je fünf  $\alpha$ -Helices sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Die komplexierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen werden durch Kugeln symbolisiert.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen der Annexine unterscheiden sich in ihrer Struktur von dem typischen Helix-Loop-Helix-Motiv in Typ I-Calciumbindungsstellen (EF-Hand) und wurden daher Typ II- und Typ III-Bindungsstellen genannt. Im Vergleich zu EF-Hand-Proteinen ist die Affinität der Annexine für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sehr niedrig und wird erst in Gegenwart von Phospholipiden um das 100-fache erhöht<sup>[14]</sup>. Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen und Kristallisationsexperimenten konnte die strukturelle Anordnung der Annexin-Lipid-Wechselwirkung charakterisiert werden. Die Ergebnisse zeigten, daß die Annexinmoleküle mit ihrer konvexen Seite an die Membran binden, wobei die gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine verbrückende Position zwischen dem Protein und den negativ geladenen Phospholipiden einnehmen<sup>[15,16]</sup>. Obwohl die generelle Struktur der Kerndomäne für alle Annexine sehr ähnlich ist, zeigten Kristallstrukturen Unterschiede in der Anzahl und genauen Lokalisation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen. Hierin könnte der Grund für die unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten und Phospholipidspezifitäten der verschiedenen Annexine liegen.

Die Abgrenzung der Annexin-Kerndomäne geht ursprünglich auf seine Stabilität gegenüber proteolytischer Spaltung zurück. Der sich anschließende N-

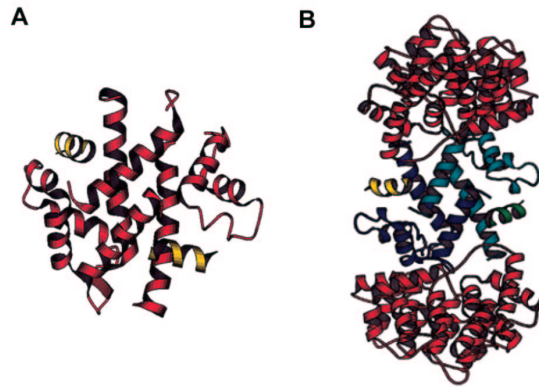
Terminus variiert im Gegensatz zum hochkonservierten Annexin-Core in Länge und Struktur innerhalb der Proteinfamilie. Im Fall von Annexin A5 ist die N-terminale Domäne nur 10 Aminosäuren lang, während die des Annexin A7 und A11 mehr als 100 Aminosäuren umfasst. In diesem Abschnitt der Proteinsequenz befinden sich sowohl Phosphorylierungsstellen als auch proteolytische Signalsequenzen<sup>[17]</sup>, worüber eine Regulierung z.B. der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität ermöglicht wird. Aufgrund der hohen Variabilität werden dem N-Terminus funktionsgebende und -regulierende Eigenschaften zugeschrieben.

Der  $\alpha$ -helikale N-Terminus des in dieser Arbeit verwendeten Annexin A2 umfasst 32 Aminosäuren und besitzt verschiedene Phosphorylierungsstellen. Die Phosphorylierung z.B. des Tyrosin-Restes Tyr-23 durch die pp60<sup>src</sup>-Kinase erniedrigt die Affinität des Proteins zu Phospholipiden und hemmt die Aggregation chromaffiner Granulae durch Annexin A2<sup>[18, 19]</sup>. Die Modifizierung durch die Kinase tritt vor allem bei membrangebundenem Annexin A2 auf. Vermutlich kommt es durch die Membranbindung zu einer Konformationsänderung im Protein, wodurch der Tyr-23-Rest für die Phosphorylierung durch das Enzym zugänglicher wird<sup>[20]</sup>. Außerdem verliert das Annexin A2 durch diese Phosphorylierung die Fähigkeit, F-Actin zu binden bzw. zu bündeln. Weitere Phosphorylierungsstellen befinden sich an den Serin-Resten Ser-11 und 25. Die Modifizierung dieser Aminosäuren durch die Protein Kinase C hat zwar wenig Einfluß auf den Membranbindungsprozeß des Annexin A2, beeinflusst aber seine Membran-Aggregationseigenschaften. Die Phosphorylierung verursacht vermutlich eine strukturelle Änderung im N-terminalen Bereich, die die für eine Membranaggregation notwendige Anordnung stört<sup>[21, 22]</sup>.

### 1.1.2 Interaktion von Annexin A2 mit S100A10 (p11)

Die ersten 14 Aminosäuren des N-Terminus von Annexin A2 bilden die Bindungsstelle für den spezifischen Proteinliganden S100A10 (p11). Das S100A10 gehört zur Familie der  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden S100-Proteine, die ca. 9-12 kDa groß sind und zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen vom EF-Hand-Typ besitzen. Die Bindung

von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen führt zu einer Konformationsänderung, die die Wechselwirkung mit Target-Proteinen ermöglicht. Im speziellen Fall des p11 ist allerdings das für die Familie typische EF-Hand-Motiv mutiert, so daß das Protein seine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungseigenschaften verloren hat. In der vorliegenden Konformation ist das p11 auch ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der Lage, als Ligand an das Annexin A2 zu binden. Die Struktur eines S100-Proteins besteht aus zwei Helix-Loop-Helix-Motiven, die über einen flexiblen Loop miteinander verbunden sind. Die beiden Helix-Loop-Helix-Motive werden über ein  $\beta$ -Faltblatt in einer nebeneinander liegenden Position gehalten. Das S100-Protein bildet ein Dimer, das über hydrophobe Interaktionen stabilisiert wird. Innerhalb der Zelle ist das p11 in einem heterotetrameren Komplex mit Annexin A2 assoziiert, wobei zwei Annexin A2 Moleküle über ein p11-Dimer verbunden sind (Abb. 1.2). Die Interaktion zwischen p11-Liganden und Annexin A2 wird über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem N-Terminus des Annexins und einer hydrophoben Bindungstasche vermittelt, die durch Teile beider S100A10-Monomere geformt wird<sup>[23, 24]</sup>.



**Abb. 1.2:** (A) Kristallstruktur des S100A10-Dimers (rot) mit Peptidfragmenten des Annexin A2 N-Terminus (gelb). Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem  $\alpha$ -helikalen N-Terminus des Annexin A2 und einer von Teilen beider p11-Monomere geformten Bindungstasche vermitteln die Assoziation der Proteine. (B) Aus kristallographischen Daten berechnete Struktur des  $(\text{A2/S100A10})_2$ -Heterotetramerkomplexes (A2t). Zwei Annexin A2 Monomere (rot) werden über ein p11-Dimer (blau) verknüpft. Da lediglich die Kristallstruktur des Annexin A2-Cores bekannt ist, sind die N-terminalen Domänen nur über die mit dem S100-Protein kokristallisierten Peptidfragmente (grün bzw. gelb) dargestellt<sup>[24]</sup>.

Während das monomere Annexin A2 im Cytosol und im Zellkern einer Zelle lokalisiert ist, findet man den heterotetrameren Komplex an die Plasmamembran oder an frühe Endosomen gebunden<sup>[18,25]</sup>. Durch die Komplexbildung werden ebenfalls die biophysikalischen Eigenschaften wie  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität und Membranaggregationsverhalten beeinflusst. Im Gegensatz zu monomerem Annexin ist der heterotetramere Komplex in der Lage, Membranen sowohl mit anderen Lipidmembranen als auch mit F-Actin-Filamenten zu verbrücken<sup>[26,27]</sup>. Das p11 konnte noch nicht in reiner Form ohne Annexin A2 aus Gewebe isoliert werden, was vermutlich auf eine metabolische Instabilität des p11 zurückzuführen ist<sup>[28,29]</sup>.

## 1.2 Biochemische Eigenschaften des Annexin A2

### 1.2.1 Calcium - abhängige Membranbindung

Annexine sind hydrophile Proteine, die im Cytosol der Zelle lokalisiert sind. Bei Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration binden sie reversibel an Membranen, wobei der jeweils zur Bindung notwendige  $\text{Ca}^{2+}$ -Level innerhalb der Proteinfamilie sehr unterschiedlich ist und von der Art des gebundenen, negativ geladenen Phospholipids abhängt. Die Affinität der Annexine sinkt von Phosphatidsäure (PA) über Phosphatidylserin (PS) zu Phosphatidylinositol (PI). Im Gegensatz zu anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinen ist die Affinität der Annexine für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen niedrig ( $K_d = 25 - 1000 \mu\text{M}$ ). In Gegenwart von Phospholipiden steigt die Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$  um das 100-fache, was bekräftigt, daß alle drei Komponenten, das Protein, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und die Phospholipide an der Komplexbildung beteiligt sind<sup>[14]</sup>.

Im Vergleich zu anderen Annexinen benötigt Annexin A2 die geringste  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration zur Membranbindung und ist *in vivo* überwiegend an zelluläre Membranen gebunden. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration für eine halbmaximale Bindung liegt für Annexin A2 im submikromolaren Bereich, während Annexin A5 mit  $10 - 100 \mu\text{M}$  die höchste  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration für eine halbmaximale Bindung benötigt<sup>[14]</sup>. Ein Vergleich der  $K_d$ -Werte von monomerem ( $K_d(\text{Ca}^{2+}) = 2 \mu\text{M}$ ) und tetramerem ( $K_d(\text{Ca}^{2+}) < 10 \text{ nM}$ ) Annexin für die Bindung von Phosphatidylserin-haltigen Vesikeln verdeutlicht die regulatorische Wirkung des p11-Liganden<sup>[18]</sup>.

### 1.2.2 Calcium - unabhängige Membranbindung

Neben der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Bindung wird seit einigen Jahren für Annexin A2 auch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Membranbindung diskutiert<sup>[30-32]</sup>. Der Mechanismus dieser Bindung ist aber noch unklar. Da sich das  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig gebundene Annexin A2t durch Cholesterin-entziehende Reagenzien von der Membran löst<sup>[33,34]</sup>, scheint Cholesterin für diese Bindung eine entscheidende Rolle zu spielen. Unklar ist jedoch, ob Cholesterin selbst als Rezeptor fungiert oder ein noch unbekannter Rezeptor, der in Cholesterin-reichen Mikrodomänen lokalisiert ist, die Bindung vermittelt. Studien an Membranmodellsystemen und frühen Endosomen konnten Cholesterin als Bindungspartner ausschließen<sup>[35]</sup> bzw. deuten auf eine Rezeptor-vermittelte Bindung hin<sup>[32]</sup>. Denkbar ist auch, daß Cholesterin eine Membranstruktur begünstigt, in der mehr Bindungsplätze durch negativ geladene Phospholipide bereitgestellt werden<sup>[31,36]</sup>. In diesem Zusammenhang wurde nicht nur eine Bindung von Annexin A2 an Cholesterin-haltige Mikrodomänen beschrieben, sondern auch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aggregation der Membranfragmente beobachtet<sup>[37,38]</sup>.

### 1.2.3 Annexin A2 als RNA - bindendes Protein

Neuere Studien identifizierten Annexin A2 als RNA-bindendes Protein<sup>[39]</sup>. Die Bindung ist Calcium-abhängig und erfolgt mit einem  $K_d(\text{Ca}^{2+})$ -Wert von ca. 10  $\mu\text{M}$ . Die Interaktion mit der RNA bewirkt eine Konformationsänderung, die die Affinität der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen erhöht. Es scheint also analog zur Phospholipidbindung, ein Komplex aus allen drei Bindungspartner relevant zu sein. Als RNA-bindendes Protein ist Annexin A2 eine Ausnahme innerhalb der Annexin-Familie, da vergleichende Experimente mit Annexin A1 bis A7 keine Assoziation an RNA nachweisen konnten. Überraschenderweise liegt die Bindungsstelle innerhalb der strukturell konservierten Kerndomäne des Proteins und ist nicht abhängig von der Komplexbildung mit dem S100A10-Liganden.

Bei *in vivo*-Experimenten mit HeLa-Zellen wurde beobachtet, daß Annexin A2 mit der c-Myc-codierenden mRNA assoziiert ist<sup>[39,40]</sup>. c-Myc ist ein mul-

tifunktionales Phosphoprotein, das im Nucleus lokalisiert ist und Vorgänge im Zellcyklus und Apoptose unterstützt. Durch die Interaktion von Annexin A2 mit der c-Myc mRNA wird der intrazelluläre Level an c-Myc hochreguliert. Annexin A2 scheint also die Stabilität oder den Transport der c-Myc mRNA zu beeinflussen.

### 1.3 Funktionen des Annexin A2 *in vivo*

Annexin A2 kommt in lebenden Zellen in verschiedenen Formen vor: monomeres Annexin A2 (A2m), heterodimeres Annexin A2 (A2d) und heterotetrameres Annexin A2 (A2t). Das monomere A2m ist im Cytosol der Zelle gelöst. Das heterodimere Annexin A2d besteht aus einem Annexin A2-Molekül und der 3-Phosphoglyceratkinase und ist im Zellkern lokalisiert. Dort konnte eine regulierende Funktion bezüglich der DNA-Polymerase  $\alpha$  nachgewiesen werden<sup>[41]</sup>. Die häufigste Erscheinungsform des Proteins ist der heterotetramere Komplex, der aus zwei Annexin A2 Monomeren und einem p11-Dimer besteht (siehe Abschnitt 1.1.2). Je nach Gewebeart variiert die relative Menge an Annexin A2t im Vergleich zu Annexin A2m von 100 % A2t in Epithelzellen des Dünndarms bis zu ca. 50 % A2m in kultivierten Fibroblasten<sup>[42, 43]</sup>. Intrazellulär ist das Annexin A2t an die Plasmamembran oder frühe Endosomen gebunden und mit den F-Actin Filamenten des darunterliegenden Cytoskeletts assoziiert<sup>[44, 45]</sup>. Obwohl es kein Signalpeptid besitzt und der Mechanismus der Sekretion unklar ist, wurde Annexin A2t auch als extrazelluläres Protein sowohl in löslicher als auch Membrangebundener Form identifiziert. Als Rezeptor für verschiedene Polypeptidliganden scheint an der Zelloberfläche gebundenes Annexin A2t, in biologische Prozesse wie die Fibrinolyseaktivierung, Zelladhäsion, Ligand-stimulierte Signalübertragung oder Virusinfektion involviert zu sein<sup>[46]</sup>.



### 1.3.1 Annexin A2 vermittelte Endo- und Exocytose

Es wird vermutet, daß Annexin A2t eine Rolle bei  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Endo- und Exocytose einnimmt<sup>[3,36,47]</sup>, indem es die sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran verknüpft<sup>[22,48]</sup>. Die Bindung an endosomale Membranen scheint dabei über eine zweite Annexin A2-spezifische Membranbindungsstelle, die im N-Terminus lokalisiert ist, vermittelt zu werden<sup>[32]</sup>. Interessanterweise ist die Assoziation mit den Endosomen nicht von einer intakten p11-Bindungsstelle (Aminosäurereste 1-14) abhängig, sondern wird von den Aminosäureresten 14-26 beeinflusst. Dies deutet auf einen Membranrezeptor hin, der ausschließlich in endosomalen Membranen lokalisiert ist und dort eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Bindung des Annexin A2 ermöglicht. Die Membran-aggregierende Eigenschaft des Annexin A2t wird durch Phosphorylierung eines Tyrosin-Restes im N-Terminus blockiert. Die in zahlreichen *in vitro*-Studien beobachtete Aggregationseigenschaft des Annexin A2t unterstützt die *in vivo* vermutete Beteiligung an endo- und exocytotischen Prozessen<sup>[11,25,49]</sup>. Außerdem ist Annexin A2 an der Bildung von  $\text{G}_{\text{M1}}$ -haltigen Mikrodomänen beteiligt, die für den Exocytoseprozess notwendig sind<sup>[48]</sup>. Inwieweit das Annexin A2t die laterale Organisation induziert oder die entstandenen Domänen stabilisiert, bleibt noch ungeklärt.

Bisher basierten die gewonnenen Erkenntnisse über die Funktion der Annexine *in vivo* auf der Überexpression von Mutanten dieser Proteine oder der Beobachtungen an *knockout* Mäusen. Interessanterweise konnten bei Mäusen, denen wahlweise die Fähigkeit zur Expression von Annexin A1, A2, A5 oder A6 fehlte, keine Fehlfunktionen in endo- und exocytotischen Prozessen festgestellt werden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Annexine und ihres gemeinsamen Vorkommens, wird eine Kompensation des fehlenden Annexins durch andere Annexine diskutiert<sup>[50]</sup>. Eine neuere Technik (*RNA interference*, RNAi) ermöglicht, spezifisch die Expression eines bestimmten Proteins zu unterdrücken. Dabei führt die Anwesenheit doppelsträngiger RNA (siRNA) zum spezifischen Abbau der entsprechenden mRNA. Zobiack et al. nutzen die RNAi erstmals, um die Aufgabe

des Annexin A2 in der lokalen Organisation der Recycling-Endosomen innerhalb der Zelle zu klären<sup>[51]</sup>. Ausschließlich der heterotetramere Komplex aus Annexin A2 und p11 sorgte für eine korrekte Positionierung der Recycling-Endosomen. Weder monomeres Annexin A2 noch p11 alleine erfüllten diese Funktion.

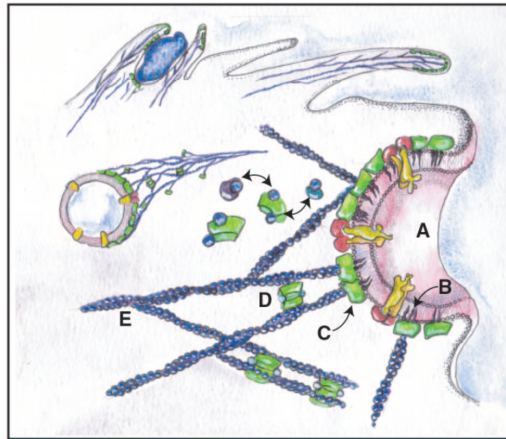
Mayran et al. waren mit Hilfe der RNAi-Technik in der Lage, eindeutig zu zeigen, daß Annexin A2 den Transport von frühen zu späten Endosomen in HeLa-Zellen reguliert<sup>[36]</sup>. Da in diesen Experimenten ausschließlich eine für Annexin A2 spezifische siRNA verwendet wurde, kann allerdings keine Aussage darüber gemacht werden, ob diese Funktion spezifisch für Annexin A2t ist oder ebenso von Annexin A2 in seiner monomeren Form übernommen werden kann.

### 1.3.2 Annexin A2 - Actin-Wechselwirkungen

Neben der Verbrückung zweier Membranen verbindet Annexin A2t zelluläre Membranen auch mit F-Actin<sup>[52, 53]</sup>. Interaktionen zwischen Zellmembranen und dem darunterliegenden Cytoskelett bewirken eine Stabilisierung der Zellform und regulieren die Zellbeweglichkeit. Über Verknüpfungspunkte mit der Plasmamembran definiert das corticale Cytoskelett Membrandomänen, über die ein Signalaustausch mit der Umgebung stattfinden kann. Um diese Aufgabe erfüllen zu können, müssen die Membran-Cytoskelett Interaktionen dynamischer Natur sein, indem sie z.B. auf Änderungen des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels reagieren.

Obwohl Annexin A2t *in vitro* in der Lage ist, F-Actinfilamente zu bündeln, konnte es innerhalb der Zelle nicht an Actinbündeln, wie z.B. *stress fibers* lokalisiert werden. Allerdings wurde Annexin A2 an dynamischeren Actin-Strukturen gefunden, die in Verbindung mit zellulären Membranen stehen<sup>[54]</sup>. Die Funktion des Annexins besteht also nicht in einer generellen Actin-Bündelung, sondern in der Assoziation der Actin-Filamente mit Membranstrukturen. Für die Ansammlung von Annexin A2-Molekülen an Actin-Bündelungspunkten scheinen Membrandomänen notwendig zu sein<sup>[27]</sup>, die auf ihrer exoplasmatischen Seite reich an Cholesterin, Sphingomyelin und Phosphatidylinositol sind (sog. *rafts*). Eine Interaktion zwischen der äußeren und inneren Membranhälfte ist über die

langen Fettsäureketten des Ceramidgrundgerüsts des Sphingomyelin und der Glycolipide möglich, so daß eine Organisation auf einer der beiden Seiten eventuell Einfluß auf die Struktur der anderen Seite nehmen kann. Die Aktivität des Annexin A2 an solchen Bündlungspunkten ist durch Phosphorylierung des Tyr-23 - Restes regulierbar<sup>[19]</sup>. *Raft* - assoziierte Kinasen können so z.B. eine durch Annexin A2 vermittelte Actin - Bündelung verhindern.



**Abb. 1.3:** Übersicht über mögliche Annexin A2-Actin Wechselwirkungen in der Zelle (verändert nach Hayes et al.<sup>[27]</sup>), z.B. **A:** entstehendes Endosom, **B:** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, **C:** Annexin A2 vermittelte Membran-Actin Assoziation, **D:** Verknüpfung zweier Actinfilamente durch A2t, **E:** Actinfilament.

### 1.3.3 Membran - organisierende Eigenschaften des Annexin A2

Die Organisation und Stabilisierung von Lipiden und Proteinen in definierten Membrandomänen ist z.B. für die Verknüpfung des Cytoskeletts mit Membranstrukturen in sog. Bündelungspunkten oder dem visikulären Transport von einem Donor - zu einem Akzeptorkompartiment in zellulären Prozessen von Bedeutung. In der Plasmamembran finden sich solche organisierten Strukturen in Form von sog. *coated pits* in denen Rezeptoren für die Aufnahme in die Zelle aufkonzentriert werden. Die Zusammenlagerung Cholesterin - reicher Mikrodomänen, auf deren exoplasmatischer Seite Glycosphingolipide und bestimmte Proteine wie

z.B. Caveolin und CD44 angereichert sind, führt zu einer lokalen Erhöhung der Rezeptorkonzentration<sup>[55,56]</sup>. In ähnlicher Weise ist eine Membranorganisation für frühe Endosomen denkbar, wobei die Moleküle für ihren Weitertransport in späte Endosomen von denen getrennt werden, die in den Recyclingprozeß zurück zur Plasmamembran eingeschleust werden.

Annexin A2 wurde zusammen mit Actin als eines der Proteine identifiziert, die spezifisch an Cholesterin-haltige Bereiche in endosomalen Membranen binden. Das Annexin war in diesen Beobachtungen nicht zufällig über die Membran verteilt, sondern in definierten Punkten lokal hoch konzentriert<sup>[33,57]</sup>. Auch auf der Plasmamembran ist das Annexin A2 nicht homogen verteilt, sondern z.B. unterhalb der apikalen Membran polarisierter Zellen gesammelt<sup>[58]</sup> oder bei J774 Makrophagen in Plasmamembranregionen wie den Mikrovilli angereichert<sup>[59]</sup>. Interessanterweise ist diese lokale Ansammlung des Annexin A2 in den meisten Fällen von einer Verknüpfung der Membrandomänen mit Actin-Filamenten des Cytoskelett begleitet<sup>[33,60]</sup>. Oliferenko et al. waren in der Lage über Colokalisationsexperimente in Epithelzellen, eine Annexin A2 abhängige laterale Aggregation von CD44-enthaltenden Lipiddomänen in der Plasmamembran und deren Anbindung an das Cytoskelett nachzuweisen<sup>[61]</sup>. Aufgrund einiger Experimente mit Annexin A2-spezifischer siRNA, die eine Cholesterin-abhängige Interaktion von Annexin A2 mit dem Protein AHNK aufzeigten, postulieren Benaud et al. für Annexin A2 zusammen mit AHNK eine regulierende Wirkung auf die Organisation des kortikalen Aktin-Cytosketts an der Plasmamembran. Neben diesen *in vivo*-Studien konnten Babiychuk und Draeger eine Annexin A2 abhängige Aggregation detergent-resistenter Membranfragmente (DRMs) nachweisen, die hauptsächlich aus Sphingo- bzw. Glycerolipiden und Cholesterin bestehen<sup>[37]</sup>. Zusammengenommen deuten alle gefundenen Ergebnisse auf eine Beteiligung von Annexin A2 an der lateralen Organisation funktionaler Mikrodomänen in zellulären Membranen hin. Ob dabei das Annexin A2 aktiv durch Protein-Protein-Kontakte oder die Wechselwirkung mit negativ-geladenen Phospholipiden an der Membranorganisation beteiligt ist oder nur eine stabilisierende Aufgabe in der Membranstruktur übernimmt, bleibt zu klären.

### 1.3.4 Beteiligung des Annexin A2 bei Krankheiten

Obwohl es keine Hinweise darauf gibt, daß durch eine Funktionsstörung eines Annexins Krankheiten ausgelöst werden, scheinen Änderungen in der Annexin-Expression oder Lokalisation pathologische Folgen zu haben. Indirekte Zusammenhänge bestehen zu Krankheiten wie Krebs, Herz- und Gefäßkrankheiten. Speziell Annexin A2 wird in Magen-, Hirn- und Brustkrebs überexprimiert<sup>[62]</sup>. Auch bei Untersuchungen anderer Krebszelllinien war die Konzentration und Lokalisation von Annexin A2 beeinflusst<sup>[63]</sup>. Annexine sind wie zuvor beschrieben cytosolische Proteine, die keine Signalsequenz besitzen, welche sie in den sekretorischen Transportweg einschleust. Annexin A2 bildet zusammen mit Annexin A1 auch in diesem Fall eine Ausnahme, da diese beiden Proteine auch außerhalb der Zelle gefunden werden. Auf der Oberfläche von Endothelzellen fungiert Annexin A2t als Rezeptor für Plasminogen, Plasmin und Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tPA)<sup>[64–66]</sup>. Plasminogen ist ein hochmolekulares, nicht-wasserlösliches Protein, das am Blutgerinnungsprozeß beteiligt ist. tPA findet in der Herzmedizin zur Auflösung von Blutgerinnseln Verwendung. Die Annexin A2t-Wechselwirkungen mit diesen extrazellulären Proteinen werden über einen C-terminalen Lysinrest des p11 vermittelt<sup>[67,68]</sup>. Zusammengenommen deuten diesbezügliche Studien auf eine regulierende Funktion der Fibrin-Polymerbildung und somit der Blutgerinnung hin<sup>[69–72]</sup>. Ein genauerer Mechanismus für diesen Vorgang wurde allerdings noch nicht vorgeschlagen. si-RNA-Studien ermöglichten jedoch durch gezielte Unterdrückung der Proteinexpression eine genauere Charakterisierung der Proteininteraktionen<sup>[73,74]</sup>. So deutet die Expressionsregulierung von p11 bzw. Annexin A2 *in vivo*-Studien daraufhin, daß p11 auch ohne die Komplexbildung mit Annexin A2 mit der Plasmamembran bzw. tPA assoziiert ist<sup>[75]</sup>. Monomeres Annexin A2 assoziierte hingegen nicht mit tPA. Des weiteren wird Annexin A2 mit Thrombose in Verbindung gebracht. Patienten mit Antiphospholipid-Antikörpern (APLAs) sind einem größeren Thromboserisiko ausgesetzt. Annexin A2 stimuliert durch Bindung von APLAs die Aktivität von Endothelzellen<sup>[76]</sup>. Das vorgeschlagene Modell beinhaltet eine laterale Aggregation des Annexin A2,

so daß entweder eine direkte Wechselwirkung mit den Antikörpern oder eine Komplexbildung mit dem  $\beta$ -Glycoprotein I ermöglicht wird, die eine Signalkaskade innerhalb der Zelle auslöst.

Außerhalb der Zelle ist Annexin A2 auch an der Infektion von Macrophagen durch HIV-1 beteiligt<sup>[77]</sup>. Eine Infektion kann verhindert werden, indem die Annexin A2 Expression mittels der RNAi- Technik unterdrückt wird oder die N-terminale Domäne des Proteins mit einem Antikörper blockiert wird. Dies deutet darauf hin, daß entweder die im N- Terminus lokalisierte Membranbindungsstelle oder die Interaktion mit p11 für die Wechselwirkung mit der Virushülle von Bedeutung ist. Der Mechanismus der Infektion läuft vermutlich über eine Bindung des Annexins an das in der viralen Membranhülle enthaltene Phosphatidylserin.

## 2 Zielsetzung

Der heterotetramere Komplex aus Annexin A2 und p11 ist nicht nur in der Lage  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an Membranen zu binden, sondern kann diese auch miteinander aggregieren. In endo- und exocytotischen Prozessen könnte diese Eigenschaft des Annexin A2t bei der Verknüpfung der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran von Bedeutung sein. Für die molekulare Anordnung des Annexin A2t an den Membrankontaktbereichen werden in der Literatur zwei verschiedene Modelle diskutiert, die sich in der Höhe des gebundenen Annexin A2t-Komplexes unterscheiden. Mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie soll die Frage der molekularen Anordnung des Annexins über topographische Analysen des membrangebundenen Proteinkomplexes geklärt werden. Festkörperunterstützte Membranen eignen sich für diese Aufgabe besonders gut, da sie für rasterkraftmikroskopische Untersuchungen gut geeignet sind und außerdem die Annexin-Membranbindung unabhängig von einem Aggregationsprozeß beobachtet werden kann. Neben der Aggregation wird für das Annexin A2t eine Membran-organisierende Eigenschaft diskutiert, die zur Bildung und Stabilisierung von Lipidmikrodomänen führt. Da *in vivo* Annexin A2t nicht aber Annexin A2m organisierende Aufgaben übernimmt, liegt ein Schwerpunkt dieser Arbeit in dem Vergleich der monomeren und heterotetrameren Proteinform. Hierzu soll zunächst, ausgehend von einem für das Annexin A2t entwickelten Modell<sup>[78]</sup>, die Reversibilität des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Bindungsverhaltens von Annexin A2m mit der Quarzmikrowaage charakterisiert werden. Mittels Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie soll die laterale Verteilung des Annexin A2t und Annexin A2m auf fluiden Membranoberflächen visualisiert werden. Desweiteren soll der Einfluß von Cholesterin und die nachträgliche Assoziation von p11 mit membrangebundenem Annexin A2m auf die laterale Verteilung des Annexin A2 untersucht werden.





## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.1.1 Isolierung von Annexin (A2/S100A10)<sub>2</sub> aus Schweinemucosa

Die Isolierung des heterotetrameren Annexin A2t Komplexes aus Schweinemucosa wurde erstmals von Gerke und Weber (1984) beschrieben<sup>[43]</sup>. Das Prinzip dieser Proteinaufreinigung basiert auf der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Membranbindung des Annexins. Das Protein wird in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an Membranfragmente der Zelle gebunden und durch Zentrifugation mit diesen pelletiert. Durch einige Waschschr tte mit  $\text{CaCl}_2$ -haltigem Puffer können lösliche Zellbestandteile abgetrennt werden. Nach Aufarbeitung des Pellets mit Ethylenglykoltetraacetat (EGTA) als  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator löst sich das Annexin A2t von den Zellfragmenten und befindet sich nach erneuter Zentrifugation im Überstand. Die erhaltene Proteinlösung kann mittels Ionenaustauschern säulenchromatographisch gereinigt werden. Man erhält auf diese Weise den heterotetrameren Annexinkomplex in hoher Reinheit.

**Durchführung:** Sechs frische Schweined nned rme wurden in ca. 1 m lange St cke geschnitten und ihr Inhalt entleert. Die mit Imidazolpuffer gespülten Teilstücke wurden der Länge nach aufgeschnitten und die Muscosa von der Innenseite abgelöst und direkt in flüssigen Stickstoff überführt. 600-700 g der tiefgefrorenen Masse wurden mit einem Hammer zerkleinert und in einem Waring-Blendor mit 1.5l Puffer A1 homogenisiert. Um bei der Aufreinigung in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem

Medium eine Proteolyse des Annexins zu vermeiden, wurde das erhaltene Gemisch mit 2.5  $\mu$ M E-64, 0.01 g/l Trypsin-Inhibitor und 2 mM PMSF versetzt. Durch Inkubation in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Puffer A2 (15 min, 4°C) bindet das Protein an die Zellfragmente. Nach Zentrifugation (50 min,  $34\,000 \times g$ , 4°C) und je zwei Waschschritten mit Puffer A2 und Puffer A3 wurde das erhaltene Pellet in 300 ml EGTA-haltigem Puffer B aufgenommen. Um das Protein möglichst vollständig von den Membranbestandteilen zu lösen, wurde die Lösung mittels eines Poters homogenisiert und 15 min gerührt. Nach erneuter Zentrifugation (60 min,  $100\,000 \times g$ , 4°C) erhält man das Protein im Überstand, welcher über Nacht gegen  $2 \times 15$  l DE-Puffer dialysiert wurde. Die Lösung wurde auf eine DE 52-Säule aufgetragen, die eine Höhe von 7 cm und einen Durchmesser von 3 cm besaß. Das im Durchlauf befindliche Protein wurde über Nacht gegen  $2 \times 15$  l CM-Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde mittels FPLC auf eine Mono-S Säule aufgetragen und das gebundene Protein mit einem linearen Salzgradienten (0 - 0.5 M NaCl in 60 min, Flußrate 1 ml/min) eluiert. Die Fraktionen, die A2t enthielten, wurden vereinigt und mit *Centrifugal Filter Devices* (Centriprep®-30, Amicon) auf Puffer E umgepuffert. Die Endkonzentration betrug ca. 8 mg/ml und wurde in Aliquots von je 40  $\mu$ l bei -20°C gelagert.

Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer sind im Folgenden aufgeführt. Der DE- und CM-Puffer enthielten zusätzlich 0.2 mM PMSF, welches jeweils kurz vor Gebrauch zugesetzt wurde. In allen Puffern war zudem noch 1 mM DTT enthalten.

Imidazolpuffer:    10 mM Imidazol/HCl, pH 7.4  
                          0.15 M NaCl

Puffer A1:        30 mM Hepes/Tris, pH 7.4  
                          0.6 M NaCl  
                          0.5 % Triton X-100

---

<u>Puffer A2:</u>	30 mM Hepes/Tris, pH 7.4 0.6 M NaCl 1 mM CaCl <sub>2</sub> 0.5 % Triton X-100
<u>Puffer A3:</u>	30 mM Hepes/Tris, pH 7.4 0.6 M NaCl 1 mM CaCl <sub>2</sub>
<u>Puffer B:</u>	30 mM Hepes/Tris, pH 7.4 0.6 M KCl 10 mM EGTA
<u>DE-Puffer:</u>	20 mM Imidazol/HCl, pH 7.5 10 mM NaCl 0.5 mM EGTA
<u>CM-Puffer:</u>	25 mM NaOAc/HOAc, pH 5.6 50 mM NaCl 0.5 mM EGTA
<u>Puffer E:</u>	3 mM Mes/NaOH, pH 6.0 0.1 M NaCl 0.5 mM EGTA

### 3.1.2 Trennung des Heterotetramerkomplexes in seine Untereinheiten

Um monomeres Annexin A2 zu erhalten, wurde der heterotetramere Komplex nach einer Vorschrift von Gerke et al. in seine Untereinheiten gespalten und diese durch Gelfiltration getrennt<sup>[42]</sup>. Hierbei wird Harnstoff als Denaturierungsreagenz verwendet. Die hervorgerufene Störung der dreidimensionalen Faltung der Proteine verhindert die zur Komplexbildung notwendigen hydrophoben Wechselwirkungen. Die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) gewährleistet, daß keine Proteinaggregate über Disulfidbrücken gebildet werden.

**Durchführung:** Das zur Aufbewahrung in MES-Puffer befindliche Protein wurde zunächst gegen 500 ml Renaturierungspuffer über Nacht dialysiert. Die Denaturierung des A2t erfolgte bei Raumtemperatur durch Dialyse gegen  $2 \times 500$  ml 9 M Harnstofflösung. Mittels Größenausschlußchromatographie mit Sephadex S-200-HR (Sigma) konnten die Untereinheiten getrennt werden. Hierzu wurden 250 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von ca. 20 mg/ml auf eine in Harnstoffpuffer equilibrierte Säule aufgetragen. Die verwendete Säule hatte einen Durchmesser von 0.9 cm und eine Höhe von 94.5 cm. Die Absorption des Eluats wurde in einer Durchflußküvette bei 280 nm detektiert. Zudem wurden die einzelnen Fraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert. Die A2m bzw. p11 enthaltenen Fraktionen wurden jeweils vereinigt und in 0.5 ml Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vor der Verwendung der Proteine wurden die Lösungen gegen  $2 \times 500$  ml Renaturierungspuffer zunächst 1 Std bei Raumtemperatur, dann über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  dialysiert.

<u>Renaturierungspuffer</u>	20 mM Tris/HCl, pH 7.5
	0.1 M NaCl
	2 mM $\text{MgCl}_2$
	1.5 mM $\text{NaN}_3$
	0.5 mM DTT

---

<u>Denaturierungspuffer</u>	20 mM Tris/HCl, pH 7.5
	0.1 M NaCl
	9 M Harnstoff
	2 mM NaN <sub>3</sub>
	3 mM DTT
	1 mM EGTA

### 3.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS - (Sodiumdodecylsulfat) - Gelelektrophorese ermöglicht die Trennung von Proteinen in Abhängigkeit ihrer Größe. Dabei überdeckt das SDS die Eigenladung der Proteine, so daß die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld nahezu ausschließlich von der Größe der Proteine abhängt. Kleinere Proteine durchwandern die Maschen des Acrylamidgels schneller als große.

**Durchführung:** Im Rahmen dieser Arbeit wurden, soweit nicht anders angegeben, 17 % tige Trenngele verwendet. Die Proteinproben wurden mit reduzierendem Probenpuffer versetzt und 5 min bei 96 °C denaturiert. Als Größenstandard wurde ein *wide range marker* der Firma Sigma verwendet, dessen genaue Zusammensetzung im Anhang aufgeführt ist. Der im Gel fließende Strom wurde konstant auf 15 mA geregelt. Die Proteinfärbung erfolgt mittels Coomassie-Brilliant Blue. Zur Aufbewahrung wurden die Gele zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet. Im Folgenden sind die verwendeten Lösungen im einzelnen aufgeführt.

<u>Laufpuffer:</u>	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	0.1 % (w/v) SDS

<u>6x-Probenpuffer:</u>	0.175 M Tris/HCl, pH 6.8 5 % (w/v) SDS 15 % (v/v) Glycerin 0.06 g/l Bromphenolblau 0.3 M DTT
<u>Färbelösung:</u>	0.5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 45 % (v/v) Methanol 18.5 % (v/v) Eisessig
<u>Entfärber:</u>	5 % (v/v) Methanol 7.5 % (v/v) Eisessig
<u>Sammelgel(4%ig):</u>	1.4 ml H <sub>2</sub> O 0.25 ml 1 M Tris/HCl, pH 6.8 0.33 ml Acrylamid-Bisacrylamid (30 %) 20 µl 10 % SDS 20 µl 10 % APS 2 µl TEMED
<u>Trenngel(17%ig):</u>	0.81 ml H <sub>2</sub> O 1.3 ml 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8 2.89 ml Acrylamid-Bisacrylamid (30 %) 50 µl 10 % SDS 50 µl 10 % APS 2 µl TEMED
<u>Trocknungslösung:</u>	20 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Glycerin

### 3.1.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationen der verwendeten Proteinlösungen wurden mittels UV - Spektroskopie bestimmt. Hierbei wird die Absorption der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin bei 280 nm genutzt, über die nach dem Lambert - Beerschen - Gesetz die Konzentration bestimmt werden kann.

$$E_{280} = \varepsilon_{280} c d \quad (3.1)$$

wobei  $E_{280}$  die Extinktion und  $\varepsilon_{280}$  der Absorptionskoeffizient bei 280 nm,  $c$  die Konzentration der Lösung und  $d$  die Schichtdicke der Küvette ist. Für A2t wurde zur Konzentrationsbestimmung ein Extinktionskoeffizient von  $\varepsilon_{280} = 0.65 \text{ cm}^2 / \text{mg}$ , für A2m  $\varepsilon_{280} = 0.75 \text{ cm}^2 / \text{mg}$  und für p11  $\varepsilon_{280} = 0.23 \text{ cm}^2 / \text{mg}$  angenommen.

Für die fluoreszenzmarkierten Proteine muß die Absorption des Farbstoffes mit berücksichtigt werden. Es wurde die Absorption sowohl bei 280 nm als auch bei 595 nm bestimmt und die Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$c = \frac{(A_{280} - (0.18 A_{595}))}{\varepsilon_{280}} \quad (3.2)$$

### 3.1.5 Proteinlabeling mit Fluoreszenzfarbstoff

Mit Farbstoffen markierte Proteine können mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Der in dieser Arbeit verwendete Texas-Red<sup>®</sup>-X Farbstoff besitzt eine Succinimidesterfunktion, die mit den primären Aminogruppen der Lysinreste eines Proteins reagieren kann. Um die Interaktionen zwischen dem Fluorophor und dem Protein möglichst gering zu halten, ist die Esterfunktion über einen sieben Atome langen Abstandhalter vom Fluorophor getrennt. Die Texas-Red<sup>®</sup>-X markierten Proteine besitzen ein Absorptionsmaximum bei 595 nm und ein Emissionsmaximum von 615 nm.

**Durchführung:** Für die Markierung der Proteine mit einem Fluoreszenzfarbstoff wurde das *Texas Red<sup>®</sup>-X Protein Labeling Kit (T-10244)* der Firma Molecular Probes verwendet. Eine ca. 20  $\mu$ M Lösung von A2t bzw. A2m in PBS-Puffer wurde mit einer 1 M  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung versetzt, um den pH auf ca. 8.3 anzuheben, da der Succinimidester in einem pH-Bereich von 7.5 - 8.5 optimal reagiert. Nach Zugabe des in DMSO gelösten Texas Red<sup>®</sup>-X Farbstoffes wurde das Reaktionsgemisch 1 Std bei Raumtemperatur gerührt. Die Abtrennung des nicht gebundenen Farbstoffes erfolgte über Größenausschlußchromatographie. Die Säulenabmessungen betrugen  $0.75 \times 17.5$  cm. Die nach ca. 2 ml eluierte Proteinbande enthielt nahezu die gesamte eingesetzte Proteinmenge ohne nennenswerte Verdünnungseffekte.

PBS - Puffer:      20 mM PBS, pH 7.4  
                         100 mM NaCl

Elutionspuffer:    10 mM  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , pH 7.2  
                         150 mM NaCl  
                         0.2 mM  $\text{NaN}_3$

### 3.1.6 Vesikelpelletierungsassays

Markiert man ein Protein mit einem Fluoreszenzfarbstoff, kann es zu Störungen der Funktionalität der Moleküle kommen. Um die Bindungseigenschaften der Annexine zu testen, wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Vesikelpelletierungsassays durchgeführt.

**Durchführung:** Für den Vesikelbindungstest wurden multilamellare Vesikel der Zusammensetzung POPC/POPS (4:1) verwendet. 2  $\mu$ M A2t wurden mit 178  $\mu$ g Lipid in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Puffer 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) 20 min bei 4°C und 15 000 x *g* zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200  $\mu$ l



$\text{Ca}^{2+}$ -Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurde das Pellet in 200  $\mu\text{l}$  EGTA-Puffer aufgenommen, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum 20 min bei 4 °C und  $15\,000 \times g$  zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 200  $\mu\text{l}$  EGTA-Puffer aufgenommen. Von den Überständen wurde jeweils eine 15  $\mu\text{l}$  Probe entnommen und mit 5  $\mu\text{l}$  reduzierendem Probenpuffer versetzt (siehe 3.1.3). Die 20  $\mu\text{l}$  Probenvolumen wurden komplett auf das Gel aufgetragen. Der Vesikelbindungstest für monomeres Annexin A2 wurde bis auf die eingesetzten Protein- und Lipidmengen entsprechend durchgeführt. In diesem Fall wurde eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  A2m und 250  $\mu\text{g}$  Lipid verwendet.

$\text{Ca}^{2+}$ -Puffer:     20 mM Tris/HCl, pH 7.4  
                         1 mM  $\text{CaCl}_2$   
                         100 mM NaCl  
                         1 mM  $\text{NaN}_3$

EGTA-Puffer:     20 mM Tris/HCl, pH 7.4  
                         1 mM EGTA  
                         100 mM NaCl  
                         1 mM  $\text{NaN}_3$

## 3.2 Biophysikalische Methoden

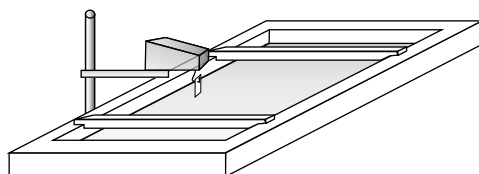
### 3.2.1 Filmwaagetechnik

Amphiphile Substanzen, d.h. Moleküle mit hydrophobem und hydrophilem Anteil wie z.B. Phospholipide, Fettsäuren oder einige Peptide, bilden an der Luft/Wasser-Grenzfläche eine monomolekulare Schicht aus. Mit Hilfe der Filmwaagetechnik können diese Monoschichten in Abhängigkeit der Temperatur, der Zusammensetzung der wässrigen Phase und des Oberflächendrucks charakterisiert werden<sup>[79,80]</sup>. Der Oberflächendruck  $\Pi$  wird dabei als Differenz der Oberflächenspannung der Subphase ohne ( $\gamma_0$ ) und mit ( $\gamma$ ) einem oberflächenaktiven Film gemessen<sup>[81]</sup>.

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (3.3)$$

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lipiden befinden sich die polaren Kopfgruppen im Wasser, während die hydrophoben Kohlenstoffketten in die Gasphase ragen. Mit diesem zweidimensionalen Modell einer Lipidmonoschicht kann das Phasenverhalten der Lipide untersucht werden. Außerdem können Wechselwirkungen der Lipidschicht mit z.B. Proteinen oder Peptiden charakterisiert werden. Amphiphile Peptide werden dabei direkt mit dem Lipidfilm auf die Oberfläche aufgebracht, während hydrophile Proteine in die Subphase injiziert werden und dabei ihr Einfluß auf den Oberflächendruck detektiert wird<sup>[82, 83]</sup>.

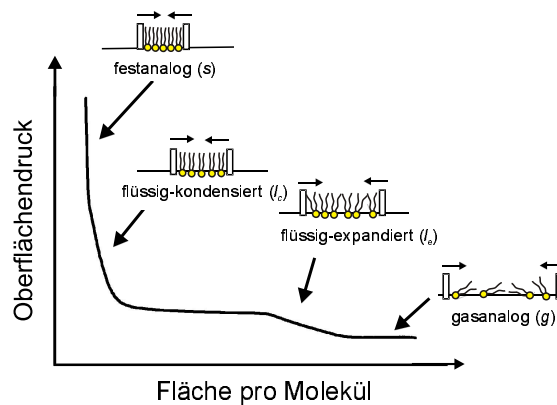
Der Meßaufbau besteht aus einem temperierbaren Teflontrog, der mit zwei beweglichen Barrieren ausgestattet ist, und einem Druckaufnehmer, dem sogenannten *Wilhelmy*-Meßsystem (Abb. 3.1). Bei diesem Meßsystem taucht ein an einer Feder befestigtes Filterpapierplättchen in die wäßrige Subphase ein, auf das Gravitation, Auftrieb und Oberflächenspannung Kräfte ausüben. Ändert sich nun der Oberflächendruck des Systems, so ändert sich die relative Position des Plättchens. Bei einer Erhöhung des Oberflächendrucks wird das Papier weniger stark in die Subphase hineingezogen, während es bei einer Erniedrigung stärker in die Flüssigkeit hineingezogen wird. Diese Positionsverschiebung wird mit der Feder des Messsystems ausgeglichen, wobei die dafür aufgewendete Kraft proportional zum Oberflächendruck ist. Die Veränderung des Oberflächendrucks wird in Abhängigkeit der den Molekülen zur Verfügung stehenden Fläche in Druck-Fläche-Diagrammen (Isothermen) dargestellt.



**Abb. 3.1:** Schematischer Aufbau einer Filmwaage mit Wilhelmy-Meßsystem.

### Phasenverhalten von Lipidmonoschichten

In Monoschichten nehmen Lipide je nach Oberflächendruck und Temperatur verschiedene Zustände an. Diese Zustandsänderungen kann man beobachten, indem die den Molekülen zur Verfügung stehende Fläche durch bewegliche Barrieren variiert wird. Die Temperatur wird hierbei im allgemeinen durch einen Thermostaten konstant gehalten. Die so erhaltenen Isothermen zeigen für die jeweils untersuchte Substanz charakteristische Phasenübergänge. In Abbildung 4.48 ist der typische Verlauf einer Isotherme am Beispiel einer DPPC-Monoschicht mit den entsprechenden Zuständen dargestellt.



**Abb. 3.2:** Kompressionsisotherme einer DPPC-Monoschicht mit charakteristischen Zustandsphasen.

Das Phasenverhalten in Phospholipidmonoschichten soll anhand der gezeigten DPPC-Isotherme erläutert werden. Bei niedrigen Drücken können die Moleküle einen größtmöglichen Abstand von einander einnehmen, so daß die Kohlenstoffketten freibeweglich und vollkommen ungeordnet vorliegen. In diesem gasanalogen Zustand (*g*) finden kaum Wechselwirkungen statt. Verringert man die Oberfläche des Systems, so verkleinert sich der Abstand der Lipide, die Fettsäureketten richten sich auf und Abstoßungskräfte treten auf, wodurch der Oberflächendruck ansteigt. Der Oberflächendruck, bei dem dies geschieht, ist im allgemeinen sehr klein ( $\Pi < 1 \text{ mN/m}$ ), was die geringe Interaktion zwischen den hydrophoben Ketten und der wässrigen Phase verdeutlicht. Diesen Zustand, in dem die Moleküle

zwar miteinander wechselwirken, die Kohlenstoffketten jedoch noch frei beweglich sind, bezeichnet man als flüssig - expandierte Phase (*liquid - expanded*,  $l_e$ ). Bei weiterer Flächenverringern kommt es zu einem Phasenübergang erster Ordnung, bei dem die Moleküle dichter gepackt werden. Die Lipide befinden sich nun in der flüssig - kondensierten Phase (*liquid - condensed*,  $l_c$ ), die sich durch eine geordnete Anordnung der Ketten auszeichnet. Der Phasenübergang, in dem die  $l_e$  - mit der  $l_c$  - Phase koexistiert, ist im Verlauf der Isotherme an einem Plateau zu erkennen. Die geordnete Phase tritt meistens bereits bei einer Fläche pro Molekül weit unterhalb der für aufrechtstehende Kohlenstoffketten angenommenen  $20 \text{ \AA}^2$  pro Kette auf. Die Ketten stehen in diesem Fall in einem je nach Phospholipid unterschiedlichen Winkel zur Oberflächennormalen. Bei weiterer Kompression des Oberflächenfilms richten sich die Ketten immer weiter auf, so daß am Ende eine möglichst dichte Packung in der *all-trans* - Konformation entsteht. Diesen Zustand bezeichnet man als fest - analog (*solid*,  $s$ ). Außerdem kommt es in diesem Stadium zu einer weitgehenden Dehydratisierung der Lipidkopfgruppen. Ist die Kompressibilitätsgrenze der monomolekularen Schicht erreicht, kommt es zu einem Filmkollaps, wobei dreidimensionale Aggregate in die wäßrige Subphase abtauchen. Der Verlauf einer Isotherme und das Phasenverhalten einer Lipidmonoschicht sind abhängig von der Länge und dem Sättigungsgrad der hydrophoben Kohlenstoffketten sowie der Kopfgruppe des jeweils betrachteten Lipids.

### 3.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

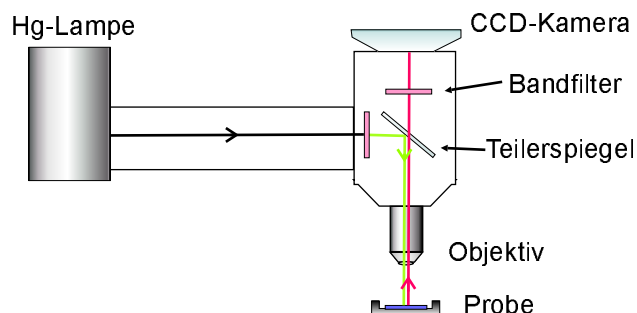
Die Fluoreszenzmikroskopie basiert auf der Tatsache, daß einige Moleküle einen Teil des von ihnen absorbierten Lichts in Form von Strahlung wieder abgeben. Durch die Absorption von Licht werden dabei Elektronen von einem Zustand niedriger Energie in einen angeregten Zustand höherer Energie überführt. Die Desaktivierung des angeregten Zustandes kann entweder strahlungslos oder durch Emission von Strahlung erfolgen, welche im Fall der Fluoreszenz gegenüber dem Anregungsspektrum zu größeren Wellenlängen verschoben ist. Fluoreszenz wird

meistens bei aromatischen und heterocyclischen Molekülen beobachtet, insbesondere wenn diese mehrere kondensierte Ringe enthalten.

Die Verwendung fluoreszenzmarkierter Lipide ermöglicht Untersuchungen an Membranmodellsystemen. So kann z.B. das Phasenverhalten in Lipidmonoschichten an der Luft/Wasser - Grenzfläche<sup>[82, 84]</sup> oder Domänenbildung in festkörperunterstützten Membranen sowie Vesikeln visualisiert werden<sup>[85]</sup>. *In vivo* ermöglicht die Fluoreszenzmikroskopie z.B. die Lokalisierung von Proteinen innerhalb einer Zelle. Dabei ist es möglich, die Änderung der Lokalisation als Antwort der Zelle auf bestimmte Stimuli zu verfolgen. In der Regel werden hierbei gelabelte Antikörper als Fluoreszenzmarker verwendet. Außerdem kann das *green fluorescent protein* (GFP) über Klonierungstechniken an ein Protein assoziiert werden und die natürliche Fluoreszenz des GFP zur Visualisierung genutzt werden.

### Prinzip eines Auflicht-Fluoreszenzmikroskops

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Auflicht-Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss verwendet, dessen schematischer Aufbau in Abbildung 3.3 dargestellt ist. Als Lichtquelle dient eine Quecksilberdampflampe, deren Spektrum einen Bereich von 270 - 600 nm umfasst. Ein Eingangsbandfilter lässt nur den zur Anregung des verwendeten Fluorophors notwendigen Wellenlängenbereich passieren. Die Anregungsstrahlung trifft auf einen dichroitischen Teilerspiegel, von wo sie auf die Probe reflektiert wird. Das langwelligere Emissionslicht des angeregten Fluorophors kann den dichroitischen Spiegel passieren und trifft auf den Ausgangssperrfilter. Dieser absorbiert störendes Streulicht, während er für das Emissionslicht durchlässig ist. Das Fluoreszenzbild kann entweder durch das Okular betrachtet oder mit einer CCD-Kamera digitalisiert werden. Die Verwendung unterschiedlicher Objektive liefert verschiedene Vergrößerungen der Probenoberfläche.



**Abb. 3.3:** Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.

**Durchführung:** Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Axiotech Vario Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) erhalten, das mit einem Achroplan 40x/0.80 W Objektiv ausgestattet war. Um die dem Fluorophor entsprechenden Wellenlängen zu filtern, wurde Filtersatz 45 (BP 560/40, FT 585, BP 630/75) verwendet. Als Probenhalterung diente ein Nunc - Petrischälchen, in dem die Festkörpersubstrat durch einen Magneten fixiert war. Aus einer Stammlösung des fluoreszenzgelabelten Proteins wurde jeweils soviel Lösung zugegeben, daß eine Mindestkonzentration von  $c \geq 0.3 \mu\text{M}$  erreicht wurde, um eine maximale Bindung an die Oberfläche zu gewährleisten. Nach einer Inkubation von 15 min, wurde die überstehende Lösung mehrfach durch frischen Puffer ausgetauscht, wodurch nicht gebundenes Protein aus der Probe entfernt und so die Hintergrundfluoreszenz minimal gehalten wurde. Alle Messungen wurden in 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  - Puffer durchgeführt (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ).

### 3.2.3 Quarzmikrowaage - Technik

Mittels der Quarzmikrowaage (*quartz crystal microbalance*, QCM) kann die auf einer Quarzoberfläche abgeschiedene Masse quantifiziert werden. Für dieses Verfahren macht man sich den inversen piezoelektrischen Effekt zunutze, wodurch die verwendeten Quarze zur Schwingung angeregt werden können. Unter dem piezoelektrischen Effekt versteht man eine durch mechanische Deformation an der Oberfläche eines Kristalls erzeugte elektrische Ladung. Der inverse piezoelektrische Effekt, der in der QCM-Technik Anwendung findet, ist entsprechend die

mechanische Deformation eines Kristalls durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Voraussetzung für diesen Effekt ist das Fehlen eines Inversionszentrums im Kristallgitter. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung kommt es zu einer Verschiebung der Dipole entsprechend der Polarisierung des Feldes. Je nachdem aus welcher Schnittebene bezüglich der Kristallachsen im Quarzkristall die Quarzscheibe entnommen wird, ändert sich ihre Schwingungsform. Man unterscheidet zwischen Biege-, Dehnungs-, Flächen- und Dickenscherswingern. In der QCM-Technik werden vor allem sog. AT-cut-Quarze verwendet, die eine Dickenscherswingung ausführen und deren Resonanzfrequenz sich durch eine geringfügige Temperaturabhängigkeit auszeichnet. Sie werden in einem Winkel von  $35^\circ 10'$  zur kristallographischen z-Achse aus dem Kristall geschnitten. Dieser Dickenschwinger wird durch Applikation einer Spannung zur Schwingung nahe der Resonanzfrequenz angeregt. Der Quarz dient als aktives Bauelement in einem Oszillatorschaltkreis, in dem die im System auftretende Dämpfung über eine rückgekoppelte Verstärkerschaltung phasenrichtig ausgeglichen wird. Die entstehende Scherswingung in Form einer stehenden Welle besitzt eine Knotenebene bei  $z=0$  und einen Schwingungsbauch bei  $z = \pm d_q/2$ <sup>[86,87]</sup>. Seit die QCM in den 80er Jahren auch für Messungen in Flüssigkeiten zugänglich wurde, findet diese Technik vermehrt in der Chemo- und Bioanalytik Anwendung. So können Proteinadsorptions- und Desorptionsprozesse, Mikroorganismen oder DNA-Bindung untersucht werden<sup>[87–90]</sup>.

Das Meßprinzip der QCM basiert auf der Verringerung der Resonanzfrequenz des Quarzes bei Belegung seiner Oberfläche mit einer Masse. Genauer gesagt ist die Resonanzfrequenz abhängig von der Dicke des verwendeten Quarzes:

$$f_0 = \frac{1}{2 d_q} \sqrt{\frac{\mu_q}{\rho_q}} \quad (3.4)$$

wobei  $f_0$  die Resonanzfrequenz,  $d_q$  die Dicke,  $\mu_q$  das Schermodul und  $\rho_q$  die Dichte des Quarzes ist. Wie aus Gleichung 3.4 ersichtlich ist, läßt sich durch Reduzierung der Dicke des Quarzes seine Resonanzfrequenz und damit auch die Empfind-

lichkeit der Massenabscheidung erhöhen. Eine praktikable Handhabung limitiert allerdings die Dicke des Quarzes, so daß sich in der Praxis Quarze mit Resonanzfrequenzen zwischen 5 und 30 MHz bewährt haben.

Ein theoretischer Zusammenhang zwischen der Frequenzänderung  $\Delta f$  und der Massenänderung  $\Delta m$  wurde 1959 von Sauerbrey aufgestellt<sup>[91]</sup>, wobei einige Randbedingungen berücksichtigt werden müssen. Bei dem abgeschiedenen Körper muß es sich um eine starre Masse handeln, die nicht mehr als 0.5 % der Quarzmasse beträgt und eine ähnliche Dichte besitzt. Zudem muß die Bindung gleichmäßig auf der Oberfläche erfolgen.

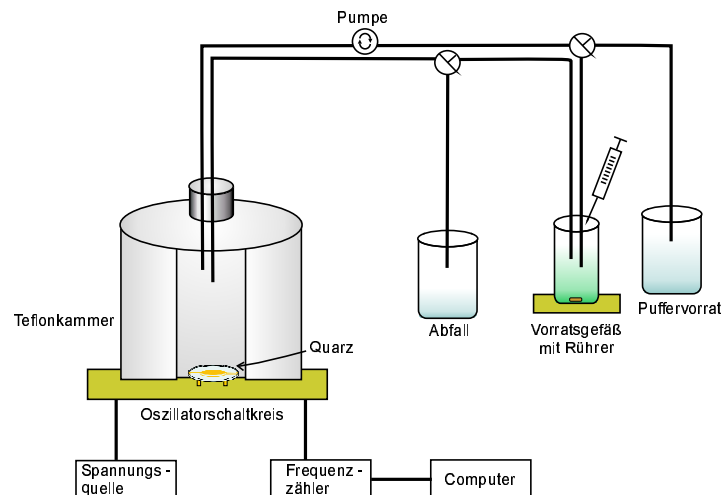
$$\Delta f = -f_0 \frac{\Delta d}{d_q} = -\frac{2 f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\mu_q \rho_q}} = -C_f \Delta m \quad (3.5)$$

Dieser lineare Zusammenhang ist nur für Messungen an Luft bzw. im Vakuum gültig. Für die Anwendung in Flüssigkeiten muß die Fortsetzung der Scherwelle in das oberhalb des Quarzes befindliche Medium berücksichtigt werden. Die Scherwelle pflanzt sich senkrecht zur Quarzoberfläche fort und wird je nach Dichte und Viskosität der Flüssigkeit unterschiedlich stark gedämpft. Für den Fall einer Newtonschen Flüssigkeit haben Kanazawa und Gordon 1985 einen Zusammenhang zwischen der Resonanzfrequenzänderung und den Eigenschaften der Flüssigkeit hergestellt<sup>[92]</sup>:

$$\Delta f = -f_0^{\frac{3}{2}} \sqrt{\frac{\mu_L \rho_L}{\pi \mu_q \rho_q}} \quad (3.6)$$

**Durchführung:** Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Quarze besitzen eine Resonanzfrequenz von 5 MHz. Die Kontaktierung erfolgte über zwei aufgedampfte Goldelektroden, die über Federkontakte mit einem Oszillatorschaltkreis verbunden wurden. Dieser Schaltkreis regt zum einen den Quarz zur Schwingung an und detektiert zum anderen die Resonanzfrequenz des Quarzes. Durch einen Frequenzzähler wird die Resonanzfrequenz ausgelesen und digitalisiert, so daß per Computer ein Frequenz - Zeit - Diagramm aufgezeichnet werden kann. Abbildung 3.4 zeigt eine schematische Darstellung der QCM-Meßapparatur.





**Abb. 3.4:** Schematischer Meßaufbau einer Quarzmikrowaage.

Um die elektronischen Bauteile von der Flüssigkeit abzuschirmen, wurde der Quarz in einer Teflonkammer zwischen zwei Dichtringe gespannt. Diese abgeschlossene Meßkammer war über einen Pumpkreislauf mit einem Eppendorfgefäß verbunden, über das Proteinlösungen eingespritzt werden konnten. Durch Umschalten auf einen zweiten Pumpkreislauf war es möglich, nicht gebundenes Protein aus der Probenlösung zu entfernen. Der Meßaufbau befand sich in einem auf 20 °C temperierten Faraday-Käfig.

### 3.2.4 Rasterkraftmikroskopie

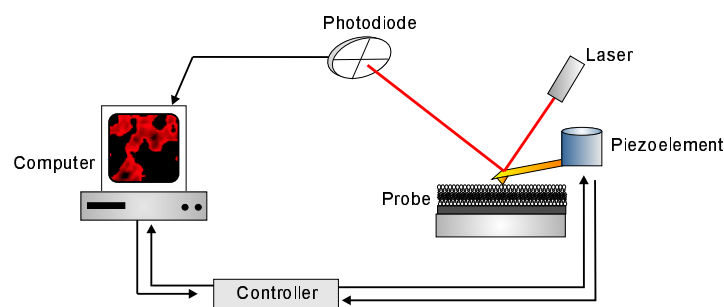
Die Rasterkraftmikroskopie gehört zur Familie der Rastersondenmikroskopietechniken, deren erstes Mitglied das Rastertunnelmikroskop war. Die Rastertunnelmikroskopie (*scanning tunnel microscopy*, STM) wurde zum ersten Mal 1982 von Binnig und Rohrer vorgestellt<sup>[93]</sup>. In der STM rastert eine Metallspitze in einem Abstand von weniger als 1 nm über eine Probenoberfläche. Der Abstand wird über den auftretenden Tunnelstrom zwischen Atomen der Oberfläche und der Spitze kontrolliert. Dieses Meßprinzip erlaubt atomare Auflösung, ist aber auf leitende Oberflächen beschränkt. Mit der Erfindung des Rasterkraftmikroskops (*scanning force microscope*, SFM) 1986 durch Binnig, Quate und Gerber<sup>[94]</sup> wurde die-

se Einschränkung, allerdings auf Kosten der Auflösung, aufgehoben. Mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie können Oberflächen in wässrigen Medien sowohl in vertikaler als auch in lateraler Richtung mit einer Auflösung von bis zu 0.1 nm abgebildet werden. Da im allgemeinen bei der Rasterkraftmikroskopie davon ausgegangen wird, daß die Kräfte zwischen den Atomen an der Spitze und den Atomen an der Oberfläche die Auflösung bestimmen, ist für diese Technik auch der Name *atomic force microscopy* (AFM) gebräuchlich.

Durch geeignete Probenkammern und Isolation der Elektronik kann die Rasterkraftmikroskopie auch in Flüssigkeiten angewendet werden. Daher findet diese Technik immer mehr Verwendung in biologischen Fragestellungen. So können z.B. Proteine oder DNA-Moleküle unter physiologischen Bedingungen abgebildet und ihre Wechselwirkungen mit verschiedensten Substraten untersucht werden<sup>[95–97]</sup>. Zahlreiche Studien an festkörperunterstützten Lipidschichten konnten Einblicke in die Struktur und das Phasenseparationsverhalten unterschiedlichster Lipidmischungen geben<sup>[51,96,98,99]</sup>. Verschiedene Betriebsmodi, wie *lateral force*<sup>[100]</sup>-Mikroskopie, *phase imaging*<sup>[101]</sup>, *pulsed force*<sup>[102,103]</sup>- oder *force modulation*-Modus<sup>[104]</sup>, liefern zusätzlich Informationen über Materialeigenschaften wie Adhäsion, Elastizität oder Oberflächenladung.

In der Rasterkraftmikroskopie ist die Meßspitze an eine flexible Tastfeder (*cantilever*) gekoppelt. So führen attraktive bzw. repulsive Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probenoberfläche zu einer Verbiegung des *cantilevers*. Zur Aufzeichnung dieser Verbiegung wird das Lichtzeiger-Prinzip verwendet. Ein Laserstrahl wird auf die reflektierende Oberfläche des *cantilevers* gerichtet und von dort auf eine Vierquadranten-Photodiode reflektiert. Diese optische Methode verwandelt die kleine Auslenkung des *cantilevers* in eine detektierbare Meßgröße - die Position des Laserspots auf der Photodiode. Gleichzeitig ermöglicht die Verwendung einer Photodiode die Digitalisierung der Daten, so daß die entstehenden Oberflächenbilder mittels eines Computers dargestellt werden können. Die Unterteilung der Photodiode in vier Quadranten erlaubt neben der Detektion der z-Auslenkung des *cantilevers* auch die Aufzeichnung seiner Torsion, die sich als laterale Positionsänderung des Laserspots äußert. Die Torsion des *can-*

*tilevers* steht in direktem Zusammenhang mit der Reibung zwischen Spitze und Probe. Je größer die Reibung desto stärker wird der *cantilever* lateral verbogen. Diese sog. *lateral force* - Mikroskopie ermöglicht die Darstellung unterschiedlicher Materialeigenschaften innerhalb der Probenoberfläche. Der Bildaufbau in Rastersondenmikroskopietechniken erfolgt durch zeilenweises Abrastern der Oberfläche, indem die über eine Halterung an ein Piezoelement gekoppelte Spitze in x,y-Richtung über die Probe bewegt wird. Über einen Regelkreis aus Photodiode, Piezoelement und Controller kann der Abstand zwischen Probe und Spitze konstant gehalten werden, so daß ein dreidimensionales Bild der Probenoberfläche entsteht. In Abbildung 3.5 ist der Aufbau eines Rasterkraftmikroskops mit dem Lichtzeiger - Prinzip schematisch dargestellt.



**Abb. 3.5:** Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops. Durch einen Regelkreis zwischen Controller, Piezoelement und Photodiode können topographische Abbildungen der Probenoberfläche erstellt werden. Ändert sich die *cantilever* - Verbiegung aufgrund topographischer Änderungen der Oberfläche, verschiebt sich die Position des Laserspots auf der Photodiode. Dies wird vom Controller registriert und die Ausdehnung des Piezoelements so verändert, daß die ursprüngliche Position des Laserspots auf der Photodiode (*setpoint*) wieder erreicht ist. Über das Ausmaß der Piezobewegung kann dann computerunterstützt ein Topographiebild der Oberfläche berechnet werden.

Die bei der Annäherung der Spitze an die Probe auftretenden Wechselwirkungen kann man sich anhand der sog. Kraft - Abstands - Kurven verdeutlichen. Die von dem Spitze - Probe - Abstand  $d$  abhängige Kraft, die die Federauslenkung bestimmt, kann durch das Hook'sche - Gesetz (Gleichung 3.7)

$$F(d) = k z_F \quad (3.7)$$

beschrieben werden, wobei  $F$  die Kraft,  $k$  die Federkonstante und  $z_F$  die *cantilever*-Auslenkung ist. Die Federkonstante  $k$  ist abhängig von den Abmessungen des *cantilevers*. Man berechnet sie für einen rechtwinkligen Federbalken nach folgender Gleichung:

$$k = \frac{E D^3 B}{4 L^3} \quad (3.8)$$

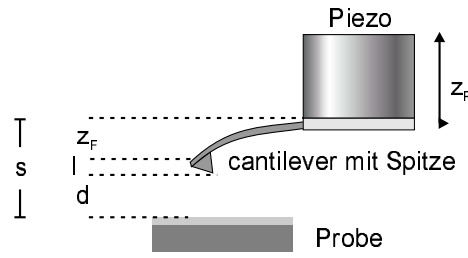
wobei  $E$  das Elastizitätsmodul,  $D$  die Dicke,  $B$  die Breite und  $L$  die Länge des *cantilevers* sind. Da sowohl die Dicke als auch die Länge in der dritten Potenz eingehen, ist die Kraftkonstante stark von diesen Parametern abhängig. Die Dicke eines *cantilevers* ist allerdings schwierig zu bestimmen und aufgrund des Herstellungsprozesses von Stück zu Stück sehr unterschiedlich. Kennt man die Resonanzfrequenz  $\omega_0$  des Federbalkens, so läßt sich darüber die Dicke und somit die Kraftkonstante über folgenden Zusammenhang berechnen:

$$\omega_0 = 0.162 \frac{\sqrt{E} D}{\sqrt{\rho} L} \quad (3.9)$$

mit  $\rho$  als Dichte des Materials. Die Kraftkonstanten der im *contact*-Modus verwendeten *cantilever* liegen typischerweise zwischen 0.01 und 5 N/m. Um die Vorgänge beim Annäherungsprozeß beschreiben zu können, muß man sich einige Zusammenhänge verdeutlichen. In Abbildung 3.6 ist der Zusammenhang zwischen Federauslenkung und Spitze/Probe- Abstand dargestellt, wobei der folgende Ausdruck gilt:

$$s = l + d - z_F \quad (3.10)$$

Dabei beschreibt  $s$  den Abstand des festen *cantilever*- Teils zur Probenoberfläche,  $l$  die Länge der Spitze,  $d$  den Spitze/Probe- Abstand und  $z_F$  die Verbiegung des *cantilevers*.



**Abb. 3.6:** Abstände zur Berechnung des Zusammenhangs zwischen *cantilever*-Verbiegung  $z_F$  und Piezobewegung  $z_P$ , wobei  $d$  der Abstand zwischen Spitze und Oberfläche,  $l$  die Länge der Spitze und  $s$  der Abstand des festen *cantilever*-Teils zur Probeoberfläche ist.

Bewegt sich nun der *cantilever* auf die Probe zu, führen attraktive Kräfte zu einer negativen *cantilever*-Auslenkung. Es gilt:

$$\Delta s = \Delta z_P \quad (3.11)$$

$$\Delta z_P = \Delta d - \Delta z_F \quad (3.12)$$

$$\Delta d = \Delta z_P + \Delta z_F \quad (3.13)$$

Setzt man diesen Ausdruck über Gleichung 3.7 in Zusammenhang mit der vom Kraftgradienten  $\frac{dF(d)}{dd}$  abhängigen Änderung der Federauslenkung, kann man die Steigung  $\frac{\Delta z_F}{\Delta z_P}$  der Kraft - Abstands - Kurve in Abhängigkeit vom Kraftgradienten beschreiben:

$$\frac{dF(d)}{dd} \Delta d = k \Delta z_F \quad (3.14)$$

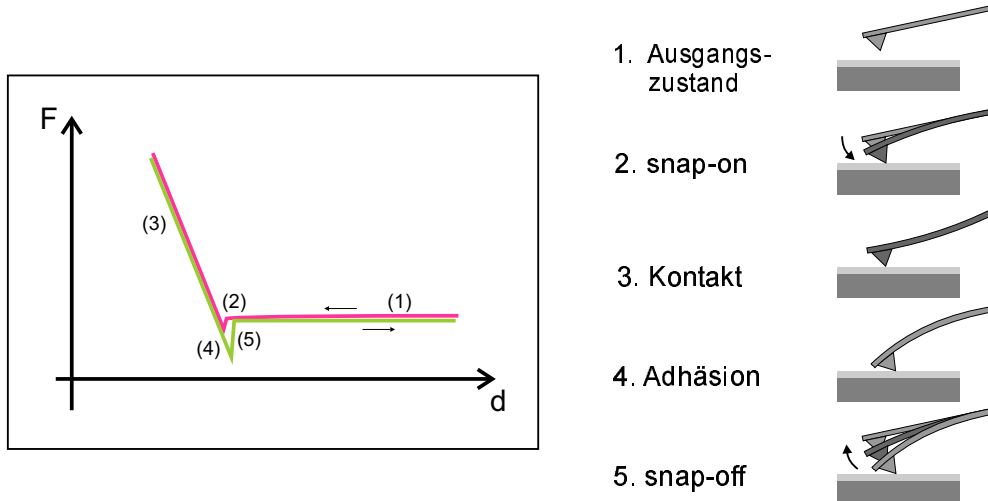
Hieraus ergibt sich mit Gleichung 3.13

$$k \Delta z_F = \frac{dF(d)}{dd} (\Delta z_P + \Delta z_F) \quad (3.15)$$

bzw. nach Umformung die folgende Gleichung für die Steigung der Kraftkurve.

$$\frac{\Delta z_F}{\Delta z_P} = \frac{1}{\frac{k}{\frac{dF(d)}{dd}} - 1} \quad (3.16)$$

Mit diesen Überlegungen läßt sich der Kurvenverlauf in Abbildung 3.7 veranschaulichen. In der Ausgangsposition (1) ist der *cantilever* so weit von der Probe entfernt, daß es keine Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe gibt. Die Auslenkung bleibt somit konstant. Bei der Annäherung an das Substrat führen attraktive Kräfte langsam zu einer negativen *cantilever*-Auslenkung. An einem bestimmten Punkt (2) ist der Kraftgradient zwischen Probe und Spitze auf die Größe der Federkonstanten angewachsen. Für diesen Fall gilt  $\frac{dF(d)}{dd} = k$ , was in Gleichung 3.16 den Nenner zu Null werden läßt. Es kommt zur mechanischen Instabilität, was sich im sog. *snap-on* (2) zeigt. Die Spitze tritt hier abrupt in repulsiven Kontakt mit der Oberfläche. Nähert sich der *cantilever* weiter der Probe an, steigt der Kraftgradient, so daß  $\frac{dF(d)}{dd} \gg k$  gilt. Damit läßt sich Gleichung 3.16 zu  $\frac{\Delta z_F}{\Delta z_P} = -1$  vereinfachen, was in einer 1:1-Bewegung von *cantilever*-Verbiegung und Piezobewegung resultiert. In der Kraft - Abstands - Kurve zeigt sich dieses Verhalten in einem Geradenverlauf mit der Steigung -1 (3). Der Abstand zwischen Probe und Spitze bleibt in diesem Bereich konstant.



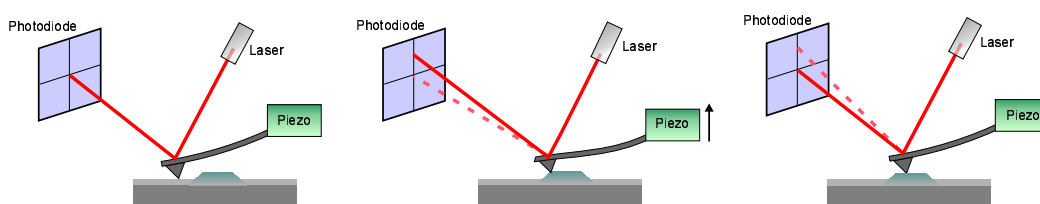
**Abb. 3.7:** Links: Darstellung einer allgemeinen Kraft - Abstands - Kurve. Rechts: Entsprechend des Kurvenverlaufs auftretende *cantilever* - Verbiegungen.

Zieht sich nun das Piezoelement wieder zusammen, wird die Spitze wieder von der Probenoberfläche entfernt. Aufgrund attraktiver Adhäsionskräfte löst sich der *cantilever* nicht direkt von der Probenoberfläche. Es kommt zu einer negativen

Auslenkung der Tastfeder (4). Analog zum *snap-on* kommt es zu einer mechanischen Instabilität, dem *snap-off* (5). Der Kontakt zwischen Spitze und Probe löst sich schlagartig und die *cantilever*-Auslenkung ist wie zu Beginn konstant<sup>[105]</sup>. Kraftkurven lassen sich zur sog. Kraftspektroskopie verwenden. So eignet sie sich z.B. zur Bestimmung der Bindungsstärke von Basenpaarungen<sup>[106]</sup> oder zur Charakterisierung intramolekularer Wechselwirkungen in Proteindomänen<sup>[107]</sup>.

### Der *contact* - Modus

Im *contact*-Modus ist die Spitze im repulsiven Kontakt mit der Probe und rastert mit einem über eine definierte Kraft bestimmten Abstand die Oberfläche ab. Die Regelgröße für den Abstand zwischen Spitze und Oberfläche ist in diesem Modus die vertikale Verbiegung des *cantilevers*, welche durch die Reflektion des Laserstrahls auf der Photodiode ausgelesen wird. Trifft die Spitze während des Scanvorgangs auf eine Erhöhung ändert sich die Verbiegung des *cantilevers* und entsprechend die Position des Laserspots auf der Photodiode. Diese Abweichung wird durch eine Piezobewegung in z-Richtung ausgeglichen bis die ursprüngliche Position auf der Photodiode bzw. der konstante Abstand zwischen Spitze und Probe wieder erreicht ist (Abb. 3.8).



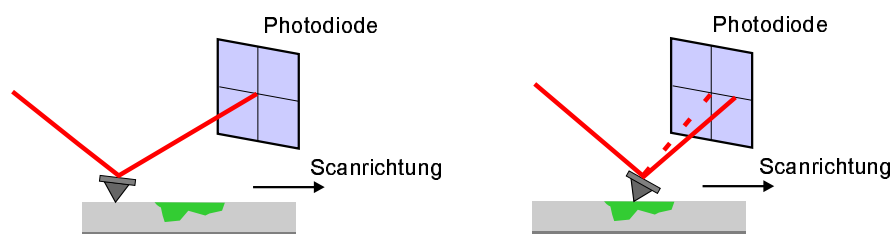
**Abb. 3.8:** Veranschaulichung der Höhenregelung im *contact* - Modus.

Durch den permanenten Kontakt zwischen Spitze und Probe ermöglicht dieser Abbildungsmodus eine hohe laterale Auflösung. In anorganischen Kristallen können so einzelne Atome oder die Untereinheiten von kristallinen Proteinen visualisiert werden<sup>[108]</sup>. Außerdem erlaubt eine relativ stabile Abbildung in vielen Fällen eine hohe Scangeschwindigkeit. Ein Nachteil dieser Methode ist die Verfor-

mung der Oberfläche vor allem bei weichen Proben. Die Deformation durch die Spitze kann zu falschen Höhenbestimmungen führen oder sogar die Oberfläche irreversibel beschädigen. Objekte, die nur lose an die Oberfläche gebunden sind, wie beispielsweise Vesikel oder einige Proteine, werden durch den *cantilever* leicht verschoben und können nur schwer abgebildet werden.

### Die Reibungskraftmikroskopie

Die Reibungskraft- oder *friction force*-Mikroskopie ermöglicht die Darstellung reibungsabhängiger Materialunterschiede. So kann man Phasenseparationen ohne Topographieunterschiede sichtbar machen. Die Abbildungen dieses Modus erhält man als Sekundärinformationen des *contact*-Modus. Dabei wird die laterale Verbiegung des *cantilevers* durch Auslesen der lateralen Positionsänderung des Laserspots auf der Vierquadranten-Photodiode aufgezeichnet. Je größer die Reibung zwischen Spitze und Probenoberfläche desto größer die Torsion des *cantilevers*. Die Farbgebung der erhaltenen Abbildungen ist für den Hin- und Rückscan jeweils invers. In der Hinbewegung wird eine größere Reibung durch eine hellere Farbe symbolisiert, während im Rückscan eine dunklere Farbe eine stärkere Reibung darstellt. Ein Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, daß zur Visualisierung der Reibungsunterschiede teils sehr hohe laterale Kräfte notwendig sind, wodurch es leicht zur Beschädigung der Oberfläche kommen kann.

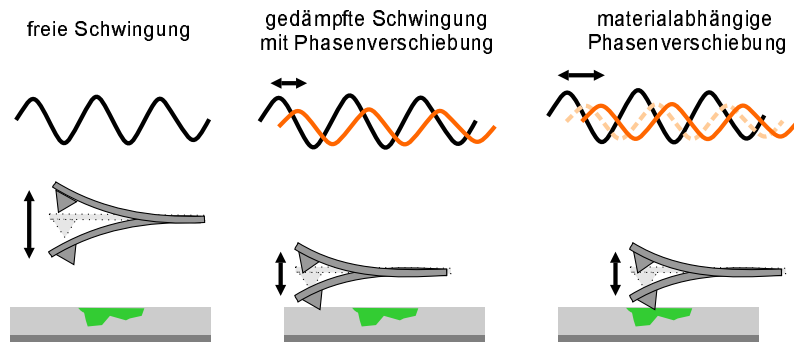


**Abb. 3.9:** Torsionsbewegung des *cantilevers* in der Reibungskraftmikroskopie.



### Der *intermittent - contact* - Modus

Der dynamische- oder auch *intermittent - contact* - Modus ist eine relativ schonende Abbildungsmethode, die vor allem bei weichen Oberflächen wie Polymeren oder biologischen Proben Anwendung findet. Der in Schwingung versetzte *cantilever* ist immer nur kurz (ca. 0.01 - 0.1  $\mu\text{s}$ ) im Kontakt mit der Probe<sup>[102, 109]</sup>. Dies minimiert die lateralen Kräfte entlang der Bewegungsrichtung, so daß weiche Proben weitgehend zerstörungsfrei abgebildet werden können und Material auf der Oberfläche nicht verschoben wird. Bei dieser Methode wird der *cantilever* durch ein Piezoelement zu einer sinusförmigen Schwingung nahe der eigenen Resonanzfrequenz angeregt. Die Resonanzfrequenzen für Messungen an Luft liegen typischer Weise bei 200 - 400 kHz, während in Flüssigkeiten *cantilever* mit Frequenzen um die 5 - 20 kHz verwendet werden. Die Amplituden dieser Schwingung liegen zwischen 30 - 100 nm<sup>[102]</sup>. Die Regelgröße zur Erstellung des topographischen Bildes ist im *intermittent - contact* - Modus die Amplitude der *cantilever* - Schwingung.



**Abb. 3.10:** Amplitudendämpfung und Phasenverschiebung in Abhängigkeit vom Material im *intermittent - contact* - Modus.

Ist der *cantilever* weit genug von der Probenoberfläche entfernt, schwingt er mit einer freien Amplitude  $A_0$  und ist in Resonanz mit seiner Erregerschwingung. Nähert sich die Spitze der Probe, so kommt es aufgrund der Wechselwirkungen zu einer Dämpfung der Schwingungsamplitude. Der Abstand zwischen Probe und Spitze wird während der Annäherung soweit verringert, bis die Schwingung

auf einen vorher eingestellten Amplitudenwert (*setpoint*) gedämpft ist. Dieser Wert wird nun über einen Regelkreis aus Photodiode, Controller und Piezoelement konstant gehalten. Ändert sich der Spitze-Probe-Abstand und damit die Schwingungsamplitude, so wird dieses über die Photodiode detektiert. Über den Controller wird das Piezoelement so in z-Richtung bewegt, daß die *setpoint*-Amplitude wieder erreicht ist. Der Computer errechnet aus der Piezobewegung ein topographisches Bild der Oberfläche.

Zusätzlich zur Höheninformation liefert der *intermittent-contact*-Modus als Sekundärsignal das sog. Phasenbild. Wechselwirkungen zwischen Probe und Spitze führen während der Abbildung zu einer Phasenverschiebung gegenüber dem freischwingenden System. Das Ausmaß der Phasenverschiebung ist von Materialeigenschaften wie Elastizität, Adhäsion oder Oberflächenladung abhängig (Abb. 3.10). Während des Abrasterns der Oberfläche wird der Phasenunterschied  $\Delta\Phi = \Phi_f - \Phi_c$  zwischen dem Phasensignal der freien *cantilever*-Schwingung  $\Phi_f$  und dem Phasensignal des wechselwirkenden *cantilevers*  $\Phi_c$  detektiert. Der Kontrast in den entstandenen Phasenbildern wird durch Unterschiede in den Materialeigenschaften bestimmt. Da die Phasenverschiebung von mehreren Faktoren beeinflusst wird, lassen sich zwar verschiedene Materialien unterscheiden, die Art des Unterschiedes, z.B. unterschiedliche Härte oder Adhäsion ist jedoch nur bedingt bestimmbar. Für die Zuordnung bestimmter Materialunterschiede eignen sich andere Betriebsmodi. So wird der *force-modulation*-Modus zur Darstellung lokaler Elastizitätsunterschiede eingesetzt. Die *pulsed-force*-Methode liefert die Möglichkeit qualitative Materialkontraste, wie Steifigkeit und Adhäsion zu untersuchen<sup>[103]</sup>.

**Durchführung:** Die Messungen wurden mit einem NanoWizard Rasterkraftmikroskop der Firma JPK Instruments AG (Berlin) durchgeführt. Bei den verwendeten Rasterkraftspitzen handelte es sich um CSC37 Silizium-*cantilever* der Firma Ultrasharp (Moskau, Russland) mit einer typischen Resonanzfrequenz von 21 kHz und einer Federkonstanten von 0.3 N/m. Die Scanrate betrug 0.3 Hz. Ein Teflonschälchen mit einem Volumen von ca. 1 ml diente als Meßkammer. In ihr

waren die auf Glimmer immobilisierten Membranen (siehe Abschnitt 3.3) mittels eines Teflonrings fixiert.

Aus einer Proteinstammlösung wurde jeweils soviel Protein zugegeben, daß eine maximale Bindung an die Oberfläche gewährleistet werden konnte. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde das ungebundene Protein durch mehrfachen Austausch der überstehenden Lösung mit frischem Puffer entfernt. Die Messungen wurden soweit nicht anders angegeben in 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ) durchgeführt.

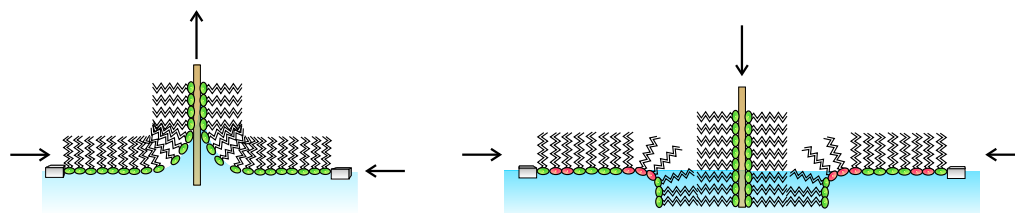
### 3.3 Membranpräparation

Die Verwendung festkörperunterstützter Lipidschichten macht Membranen verschiedensten biophysikalischen Methoden zugänglich. So können die Doppelschichten z.B. mit oberflächenanalytischen Methoden wie der Rasterkraftmikroskopie<sup>[85,96]</sup>, Flugzeit - Massenspektrometrie<sup>[110]</sup> oder Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie untersucht werden.

#### 3.3.1 Langmuir-Blodgett Technik

Die Langmuir-Blodgett (LB)-Technik bietet die Möglichkeit, Lipidmembranen auf Substraten zu immobilisieren. Man unterscheidet zwei Arten des Übertrags. Beim hydrophilen Übertrag (Abb. 3.11, links) wird der Träger in die Subphase getaucht, bevor der Lipidfilm gespreitet wird. Nachdem der Lipidfilm auf die Oberfläche aufgebracht ist, kann durch langsames Herausziehen des Trägers der Übertrag erfolgen. Dabei adsorbieren die hydrophilen Köpfe an die Trägersoberfläche und die hydrophoben Ketten ragen in die Luft. Der hydrophobe LB-Übertrag ermöglicht die Herstellung von Lipiddoppelschichten. (Abb. 3.11, rechts). Ein zuvor präparierter hydrophober Träger wird von oben in den auf der Subphase gespreiteten Film getaucht. Dabei lagern sich die Ketten durch hydrophobe Wechselwirkungen an den Träger an. Die Ausbildung von Multischichten mittels der LB-Technik gelingt nur unter Verwendung bestimmter Lipide, wie z.B. negativ geladene Phosphatidsäure (PA) bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen oder Phospha-

tidylethanolamin (PE) mit gesättigten Fettsäuren<sup>[111]</sup>. Um Doppelschichten mit Hilfe des LB-Übertrags herzustellen, wird die untere Monoschicht bei möglichst hohem Druck (ca. 45 mN/m) übertragen. Unter Verwendung eines Lipids mit gesättigten Fettsäureketten entsteht so eine dicht - gepackte Schicht, die sich gut als Unterlage für einen hydrophoben Übertrag eignet.



**Abb. 3.11:** Präparation festkörperunterstützter Lipidschichten mittels LB-Übertrag. Links: hydrophiler Übertrag, rechts: hydrophober Übertrag zur Erzeugung von Doppelschichten.

**Durchführung:** Die LB-Schichten wurden mit Hilfe einer Filmwaage der Firma Riegler & Kirstein (Mainz) präpariert, die mit einem Filmlift ausgestattet war. Der auf 20 °C temperierte Teflontrog hatte ein Fassungsvermögen von 115 ml und besaß in der Mitte eine Vertiefung, in die bei einem hydrophoben Übertrag ein Teflonschälchen eingesetzt werden konnte. Dieser ermöglichte es, die festkörperunterstützte Doppelschicht zu transportieren und zur weiteren Verwendung in wässriger Umgebung in die jeweilige Meßkammer zu überführen.

Der zu übertragende Lipidfilm wurde mit Hilfe einer Hamiltonspritze auf die Luft/Wasser - Grenzfläche aufgebracht und 30 min equilibriert. Die Kompression bis zu dem gewünschten Übertragungsdruck erfolgte mit einer Vorschubgeschwindigkeit der Barrieren von 2.9 cm<sup>2</sup>/min, worauf wiederum 30 min equilibriert wurde. Als untere Monoschicht diente 1,2 - Dipalmitoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholin (DPPC), das bei einem Druck von 45 mN/m übertragen wurde. Die obere Schicht bestand aus einer 4:1 - Mischung von DPPC und 1,2 - Dipalmitoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphoserin (DPPS), die bei einem Druck von 32 mN/m transferiert wurde. Um eine Domänenbildung des negativ geladenen DPPS zu induzieren,

wurde der Teflontrog zuvor mit einer 1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gespült. Der Transfer der Lipidschicht auf den Festkörper erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 0.2 mm/min. Dabei wurde der Oberflächendruck durch automatische Regelung der Barrieren konstant gehalten. Als Trägermaterial wurde frisch gespaltenes Glimmer verwendet.

### 3.3.2 Vesikelspreitmethode

Eine weitere Methode festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten herzustellen, ist die Vesikelspreittechnik. Hierbei adsorbieren unilamellare Vesikel auf dem Festkörper und spreiten oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur zu einer Lipiddoppelschicht. Für diesen Spreitvorgang sollten die Vesikel einen Durchmesser von 50 - 200 nm besitzen. Außerdem sollten attraktive Wechselwirkungen zwischen den Lipidvesikeln und dem Substrat herrschen<sup>[112]</sup>. Als Substrate können z.B. Glas oder Glimmer verwendet werden. Auf goldbedampften Festkörpern besteht die Möglichkeit, die Lipidschicht mittels thiolhaltiger Lipide kovalent auf der Oberfläche zu fixieren. Elektrisch dichte, defektfreie Membranen, wie sie z.B. für QCM-Messungen verwendet werden, lassen sich relativ einfach herstellen, indem man eine Goldoberfläche mit Oktanthiol beschichtet. Aufgrund der Hydrophobizität der so entstandenen Oberfläche spreiten Vesikel zu einer nahezu defektfreien Schicht.

**Durchführung:** Aus Stammlösungen von Lipidlösungen wurden Mischungen von 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC) und 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserin (POPS) im Verhältnis 4:1 hergestellt. Je 0,5 mg Gesamtlipid wurden in Reagenzgläser pipettiert und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom verblasen. Um das Lösungsmittel vollständig zu entfernen, wurden die Filme ca. 2-3 Std. oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur im Vakuum belassen. Durch Zugabe von 1 ml 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ) entstanden nach drei-

maliger Wiederholung eines 10 minütigen Quellprozesses und 30 sec vortexen multilamellare Vesikel. Die für den Spreitprozeß notwendigen unilamellaren Vesikel wurden mittels eines Liposofast (Avestin, Ottawa, Kanada) hergestellt, der mit Polycarbonatmembranen bestückt war, die einen Porendurchmesser von 50 nm besaßen. Für die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen wurden Lipidschichten auf frisch gespaltenem Glimmer hergestellt. Ein Glimmerplättchen wurde mit einer 0.5 mg/ml Vesikellösung bedeckt und von einer 1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung soviel Volumen zugegeben, daß eine Endkonzentration von 10 mM  $\text{CaCl}_2$  erreicht wurde. Nach einer 1 stündigen Inkubation wurde die Oberfläche gründlich mit frischem Puffer gespült.

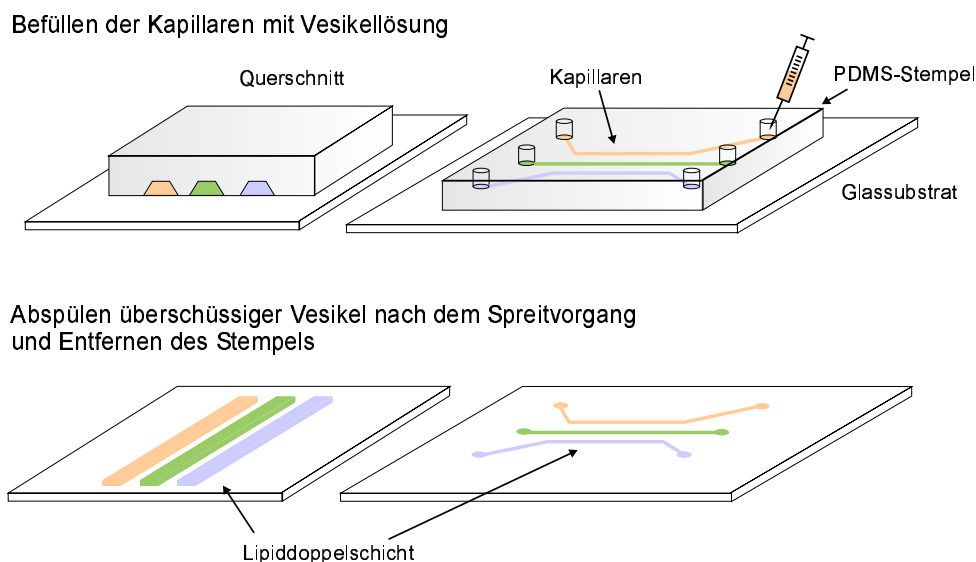
Für die QCM-Messungen wurden zunächst die frisch im Argon-Plasma gereinigten Quarze mit einer 2 mM ethanolischen Octanthiollösung überschichtet und 1 Std inkubiert. Nach 5 maligem Spülen mit Ethanol gefolgt von 5 maligem Spülen mit EGTA-Puffer (1 mM EGTA, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 20 mM Tris/HCl, pH 7.4) wurden die in diesem Fall in EGTA-Puffer präparierten unilamellaren Vesikel auf die Oberfläche gegeben und wiederum 1 Std inkubiert. Anschließend wurden die Vesikel durch mehrfachen Austausch der überstehenden Lösung mit frischem Puffer entfernt. Mittels Impedanzmessung konnte die Güte der Membran überprüft werden.

### 3.3.3 Mikrostrukturierte Membranen

Mikrostrukturierte Membranen bieten die Möglichkeit auf einem Festkörpersubstrat verschiedene Lipidmischungen nebeneinander, gleichzeitig zu untersuchen. Die einzelne Adressierbarkeit unterschiedlich rezeptorfunktionalisierter Lipidmembranen ermöglicht dabei z.B. die Verwendung als Sensor zur Detektion verschiedener Proteine in Lösung. Aufgrund der Mikrostrukturierung sind die einzelnen Lipidmembranen für hochauflösende Mikroskopietechniken wie die Rasterkraftmikroskopie zugänglich, so daß eine Proteinabsorption auf molekularer Ebene charakterisiert werden kann. In der Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die nebeneinanderliegende Anordnung der Lipidstreifen den direkten Vergleich der Fluo-

reszenzintensität, so daß z.B. Bindungsaffinitäten von Proteinen zu verschiedenen Lipidzusammensetzungen verglichen werden können.

Zur Herstellung der Membranstreifen wird ein Elastomer-Stempel verwendet, in dem nebeneinanderliegende Kapillaren getrennt befüllt werden können. Der Elastomer-Stempel besteht aus Polymethylsiloxan (PDMS), das in einer fotolithographisch in einen Siliziumträger geätzten Form aushärtet. Das Elastomer entsteht durch eine Platin-katalysierte Reaktion Vinyl-terminierter PDMS-Makromonomere, die über ein kurzkettiges Copolymergemisch vernetzt werden. Bei diesem sog. Replikatgießen besitzt die Form genau die inverse Struktur des gewünschten Elastomer-Stempels. Der auf diese Weise strukturierte Stempel wird auf einen Glasträger aufgebracht und die Kapillaren mit unilamellaren Vesikeln der gewünschten Zusammensetzung befüllt. Durch Adsorption an die hydrophile Oberfläche und anschließendes Spreiten der Vesikel entstehen so räumlich getrennte Lipiddoppelschichten. In Abbildung 3.12 ist die Herstellung mikrostrukturierter Membranen mit Hilfe des PDMS-Stempels illustriert.



**Abb. 3.12:** Herstellung mikrostrukturierter Membranen mittels eines Elastomer-Stempels.

**Durchführung:** Das zur Herstellung des Elastomer-Stempels verwendete PDMS (*Stylgard<sup>TM</sup>* 184, Dow Corning) besteht aus einem flüssigen Präpolymer (Basis) und einem Härter, der die zur Quervernetzung benötigte Platinkomponente und ein kurzkettiges Copolymergemisch aus Methyhyrosiloxan und Dimethylsiloxan enthält. Ein Gemisch mit einem Verhältnis von Basis zu Härter von 10:1 wird in die mittels Fotolithographie hergestellte Struktur gegeben und für 6 h bei 65°C ausgehärtet. Um den Einschluß von Luftblasen zu verhindern, wird das Gemisch zuvor entgast. Nach dem Aushärten wird die Oberfläche des Elastomer-Stempels für 30 sec im Sauerstoff-Plasma teilweise oxidiert und anschließend auf einem Glassubstrat fixiert. Das Glassubstrat wird zuvor in alkalischer Hellmanex-Lösung bei 70°C im Ultraschallbad gereinigt. Lösungen unilamellarer Vesikel mit einem Durchmesser von 50-100 nm werden in die Kapillaren des Stempels gefüllt und für 5 min auf dem Glassubstrat inkubiert. Nach dem Spreitvorgang wird der Stempel entfernt und überschüssige Vesikel durch Spülen mit Puffer entfernt. Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen war den Lipidmischungen 0.5 mol% des fluoreszierenden BODIPY-PC zugesetzt, um eine erfolgreiche Membranbildung zu überprüfen.

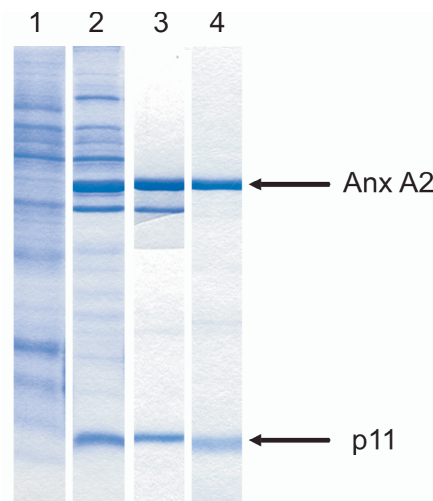


## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Isolierung und Modifizierung der Proteine

#### 4.1.1 Isolierung des Annexin (A2/S100A10)<sub>2</sub>

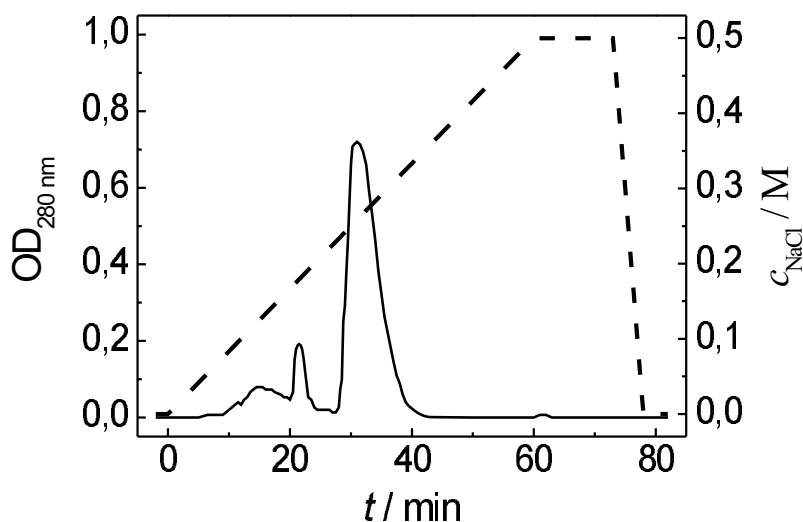
Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Annexin A2t wurde aus Schweine-darm-Mucosa wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben isoliert und der Verlauf der Aufreinigung mittels SDS-Gelelektrophorese dokumentiert (Abb. 4.1). Da eine detaillierte Charakterisierung des gewonnenen Annexin A2t bereits im Rahmen einer vorherigen Dissertation innerhalb der Arbeitsgruppe erfolgte, wird im Folgenden lediglich der grundsätzliche Ablauf der Aufreinigung dokumentiert<sup>[78]</sup>.



**Abb. 4.1:** SDS-Gele der Aufreinigung von Annexin A2t. Spur 1: Lösliche Zellbestandteile im Überstand nach Zentrifugation in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Spur 2: Überstand nach Zentrifugation in EGTA-haltigem Medium. Spur 3: Durchlauf der DE52-Anionenaustauschersäule. Spur 4: Fraktion des Hauptpeaks der Mono S-Säule.

Nach einem mechanischen Aufschluß der Darmepithelzellen wurde das Annexin A2t in Gegenwart von Calcium an zelluläre Membranfragmente gebunden und konnte durch Zentrifugation von löslichen Gewebekomponenten abgetrennt werden. Im  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Überstand der Zentrifugation befanden sich keine detektierbaren Mengen an Annexin (Spur 1). Durch Zugabe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators EGTA konnte das Annexin von den Membranfragmenten gelöst werden und befand sich nach erneuter Zentrifugation im Überstand (Spur 2). Die durch Dialyse entsalzte Lösung wurde auf eine DE52-Anionenaustauschersäule gegeben, um weitere Verunreinigungen wie negativ-geladene DNA abzutrennen. Da sich das Annexin A2t bei dem verwendeten pH oberhalb seines pI-Wertes befand und somit positiv geladen war, erfolgte keine Bindung an das Säulenmaterial und das Protein wurde bereits sehr rein im Durchfluß erhalten (Spur 3).

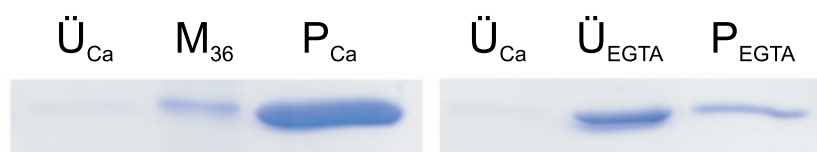
Im letzten säulenchromatographischen Reinigungsschritt wurden restliche Verunreinigungen und ein unbekanntes Protein abgetrennt, das eine dem Annexin A2m entsprechende Masse aufwies. Hierzu wurden die Proteine zunächst in einem Niedrigsalzpuffer an eine Mono S-Kationenaustauschersäule gebunden und anschließend durch einen linearen Salzgradienten eluiert. Dies ermöglichte ei-



**Abb. 4.2:** Typisches Elutionsprofil eines FPLC-Laufs der Mono S-Kationenaustauschersäule. Der von den Verunreinigungen deutlich getrennte Hauptpeak eluierte bei einem NaCl-Gehalt von 0,25 M NaCl und konnte dem Annexin A2t zugeordnet werden. Die gestrichelte Linie zeigt den linearen Salzgradienten von 0-0,5 M NaCl.

ne Abtrennung letzter Verunreinigungen und das Annexin A2t konnte in hoher Reinheit isoliert werden (Spur 4). Dieser letzte Reinigungsschritt erfolgte mittels FPLC, wobei die Elution der Proteine mit einem UV-Detektor bei 280 nm verfolgt wurde. Abbildung 4.2 zeigt den Verlauf eines typischen Elutionsprofils eines FPLC-Durchgangs, in dem ein größerer Hauptpeak und zwei kleinere Peaks zu beobachten sind. Der vordere breite Peak war auf Verunreinigungen zurückzuführen, die mit einer vorgeschalteten CM-Kationenaustauschersäule hätten abgetrennt werden können<sup>[78]</sup>. Da dieser zusätzliche Reinigungsschritt jedoch die Ausbeute herabgesetzt hätte und die Reinheit des isolierten Endproduktes nicht verbessert hätte, wurde auf diese Möglichkeit verzichtet. Der sich anschließende kleinere Peak eluierte bei einem NaCl-Gehalt von 0.17 M und konnte dem unbekannten Protein zugeordnet werden<sup>[78]</sup>. Die Elution des Annexin A2t erfolgte bei 0.25 M NaCl und war deutlich von den zuvor eluierten Fraktionen getrennt. Die Fraktionen des Hauptpeaks wurden vereinigt und zur Lagerung umgepuffert (siehe Abschnitt 3.1.1). Aus 700 g Mucosa konnten ca. 45 mg Annexin A2t gewonnen werden.

Die Funktionalität des gewonnenen Proteins wurde über einen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Vesikelassay überprüft, wobei die Bindung des Annexin A2t an die Lipidvesikel mittels SDS-Gelelektrophorese dokumentiert wurde (Abb. 4.3).



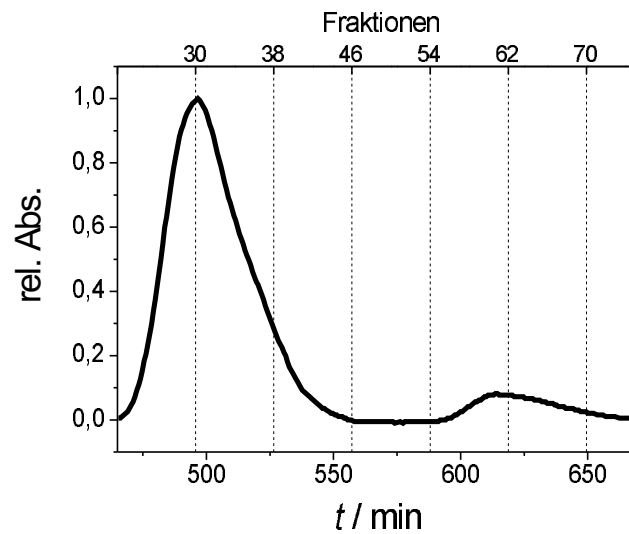
**Abb. 4.3:** SDS-Gelausschnitt eines Vesikelbindungstests von Annexin A2t mit POPC/POPS (4:1). Ü bzw. P bezeichnet jeweils den Überstand bzw. das Pellet eines Zentrifugationsschrittes. Ca und EGTA bezeichnen den jeweils verwendeten Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  bzw. EGTA, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 1 mM DTT).  $M_{36}$  zeigt eine Markerbande bei 36 kDa.

Das Annexin A2t wurde in Anwesenheit von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  20 min bei Raumtemperatur mit multilamellaren POPC/POPS (4:1) Vesikeln inkubiert, um den heterotetrameren Komplex an die Membran zu binden. Nach Zentrifugation konnte das Protein im Pellet nachgewiesen werden ( $P_{\text{Ca}}$ ), während im  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Überstand kein Annexin A2t detektierbar war. Wurde das Pellet in 1 mM EGTA-Puffer aufgenommen und 20 min inkubiert, so löste sich das Protein von der Membran und befand sich nach erneuter Zentrifugation im Überstand ( $\ddot{U}_{\text{EGTA}}$ ). Nach Abschätzung aus dem SDS-Gel blieben etwa 20 % des Annexin A2t an die Vesikel gebunden ( $P_{\text{EGTA}}$ ). Um eine unspezifische Bindung an die Lipidmembran auszuschließen wurde der gleiche Test mit reinen POPC Vesikeln durchgeführt. Hierbei war das Protein in Anwesenheit von Calcium lediglich im Überstand zu beobachten (nicht gezeigt).

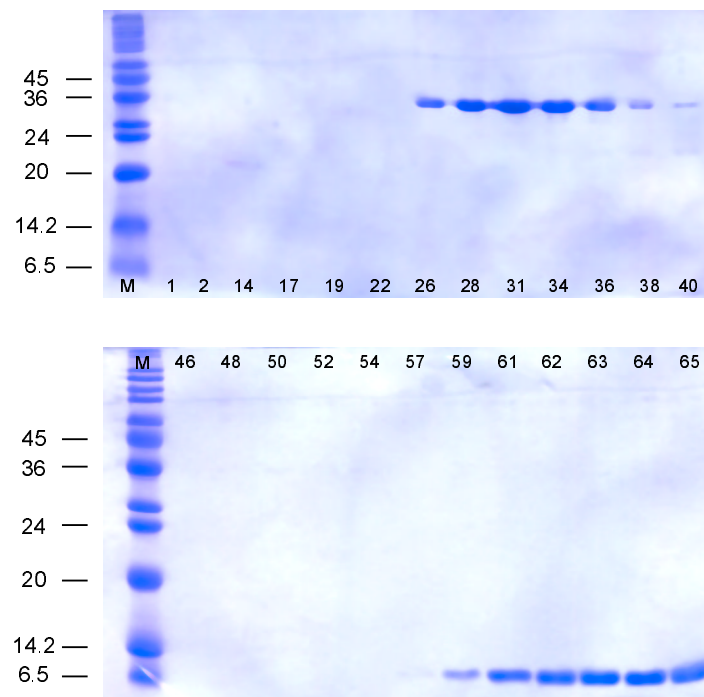
#### 4.1.2 Spaltung des Annexin A2t in seine Untereinheiten

Zur Gewinnung des monomeren Annexin A2m wurde der Annexin A2t-Komplex mit Harnstoff denaturiert, und die Untereinheiten säulenchromatographisch getrennt (siehe Abschnitt 3.1.2). Der Verlauf der Elution wurde UV-spektroskopisch und mittels SDS-Gelelektrophorese verfolgt. Abbildung 4.4 zeigt das bei 280 nm aufgezeichnete Elutionsprofil, in dem zwei durch eine Basislinie deutlich voneinander getrennte Peaks erkennbar sind. Der nach ca. 28 ml eluierte Peak konnte dem 36 kDa großen Annexin A2m zugeordnet werden. Der zweite, bei etwa 34.6 ml eluierte Peak entsprach der 11 kDa großen S100-Untereinheit.

Der Elutionsverlauf wurde ebenfalls an Hand von SDS-Gelelen dokumentiert, wodurch gleichzeitig die beiden Untereinheiten identifiziert und den entsprechenden Peaks zugeordnet werden konnten (Abb. 4.5). Die erhaltenen Annexin A2m- bzw. p11-Fraktionen wurden vereinigt, aliquotiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Vor der Verwendung wurden die Fraktionen gegen Renaturierungspuffer dialysiert, um die Proteine in ihre aktive Form zurückzufalten.

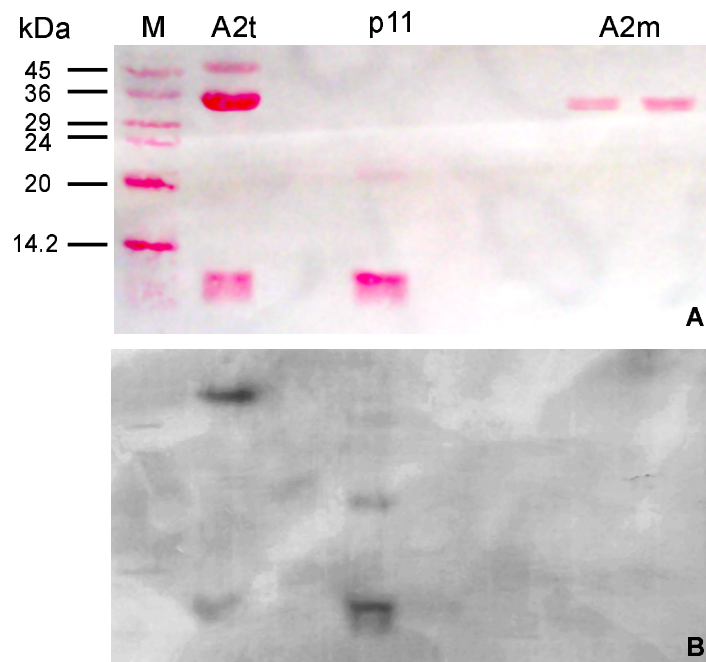


**Abb. 4.4:** Elutionsprofil der Trennung der Annexin A2t-Untereinheiten mittels Größenausschlußchromatographie. Der Verlauf der Elution wurde mit einem UV-Detektor bei 280 nm verfolgt. Die Proteinpeaks der beiden Annexin A2t-Untereinheiten waren deutlich durch eine Basislinie getrennt.



**Abb. 4.5:** SDS-Gele der einzelnen Fraktionen. Es wurden ab Fraktion-Nr. 7 je 0.2 ml Volumen gesammelt von denen je 10 µl auf das Gel aufgetragen wurde.

Mittels Western-Blot Analyse sollte gezeigt werden, daß die Annexin A2m-Fraktion tatsächlich kein p11 mehr enthielt. So konnte eine erneute Annexin A2t-Komplexbildung nach der Renaturierungsdialyse ausgeschlossen werden. Die Ponceau-Rot-Färbung zeigt einen erfolgreichen Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die Cellulosemembran (Abb. 4.6 (A)).



**Abb. 4.6:** (A) Ponceau-Rot-Färbung der Cellulosemembran nach dem Proteintransfer vom SDS-Gel. (B) Lumineszenzdetektion mittels Photopapier.

Sowohl die Banden des Größenstandards als auch die einzelnen Proteinbanden sind in der jeweiligen Spur deutlich zu erkennen. In der Spur des Annexin A2t ist eine Bande bei ca. 36 kDa, eine bei ca. 10 kDa sowie ein höhermolekulares Aggregat zu sehen, dessen Größe bei ca. 45 kDa liegt. Die angegebenen Größen wurden über eine lineare Auftragung des Logarithmus der molaren Masse der Standardproteine gegen die Laufstrecke abgeschätzt. In der Spur des p11 ist bei ca. 10 kDa und bei ca. 20 kDa je eine Bande sichtbar. In den Spuren der beiden Annexin A2m Fraktionen ist jeweils eine Bande bei ca. 36 kDa zu erkennen. Durch Inkubation mit einem p11-spezifischen Antikörper kann das S100-Protein in den einzelnen Spuren eindeutig identifiziert werden. Die Detektion der p11-

Antikörper - Wechselwirkung erfolgt über einen Sekundärantikörper, an den eine Peroxidasefunktion gekoppelt ist. Durch eine spezifische Reaktion der Peroxidasefunktion werden die entsprechenden Banden zur Lumineszenz gebracht, die mit Hilfe von Photopapier detektiert werden kann (Abb. 4.6 (B)). Das p11 aus dem heterotetrameren Annexin A2t und das reine p11 sind eindeutig durch den p11 - Antikörper identifiziert worden. Der Antikörper bindet auch an die höhermolekularen Aggregate sowohl in der Spur des Annexin A2t als auch in der des p11. In den beiden Annexin A2m - Proben ist jedoch auf dem Photopapier keine Bande erkennbar.

### 4.1.3 Charakterisierung und Funktionskontrolle der fluoreszenzmarkierten Proteine

Wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben wurden sowohl das Annexin A2t als auch das Annexin A2m mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Für die Reaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurde das Annexin A2t mit einer Konzentration von 2 mg/ml eingesetzt. Der nicht - gebundene Fluoreszenzfarbstoff wurde mittels Größenausschlußchromatographie vom Protein abgetrennt, wobei die verwendete Säule einen Durchmesser von 0.75 cm und eine Länge von 17.5 cm besaß. Die nach einem Elutionsvolumen von 2.5 ml erhaltene violette Bande konnte über SDS - Gelelektrophorese als Annexin A2t identifiziert werden, dessen Konzentration über UV - Absorption bei 280 nm und bei 595 nm zu ca. 2 mg/ml bestimmt wurde. Da das aufgefangene Gesamtvolumen der Bande dem eingesetzten Probenvolumen entsprach, wurde das eingesetzte Protein ohne Verlust oder nennenswerten Verdünnungseffekt erhalten. Das molare Verhältnis von Farbstoff zu Protein, der sogenannte Labelinggrad, wurde über folgende Formel berechnet:

$$\frac{n_F}{n_P} = \frac{A_{595}}{\varepsilon_{595} c_P} \quad (4.1)$$

Dabei ist  $n_F$  die Stoffmenge an Fluorophor,  $n_P$  die Stoffmenge von Protein,  $A_{595}$  die Absorption bei 595 nm,  $\varepsilon_{595}$  der molare Absorptionskoeffizient des Fluo-

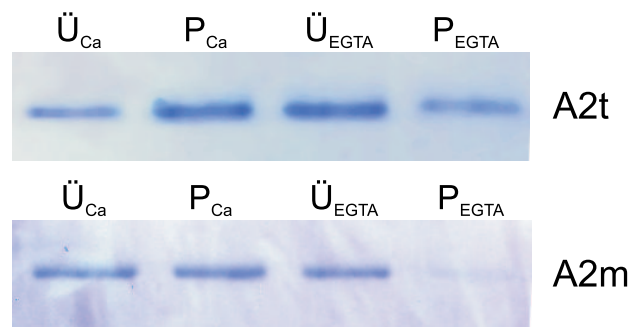
rophors bei 595 nm und  $c_P$  die Konzentration des Proteins. Für  $\varepsilon_{595}$  wurde ein Wert von 80 000 l/(mol cm) angenommen, womit sich ein molares Verhältnis von Farbstoff zu Protein von ca. 1:1 ergab.

Im Fall des Annexin A2m wurden 700  $\mu$ l einer 0.7 mg/ml Lösung eingesetzt, das zur Reinigung verwendete Gelbett war 16 cm lang und hatte einen Durchmesser von 0.75 cm. Die nach einem Elutionsvolumen von 1.8 ml erhaltene Fraktion konnte mittels SDS-Gelelektrophorese als Annexin A2m identifiziert werden und hatte bei einem Volumen von 1 ml eine Konzentration von 0.2 mg/ml. Somit wurden 41 % des eingesetzten Proteins mit Farbstoff markiert. Der restliche Anteil des Proteins war vermutlich bei der Reaktion mit dem Fluorophor ausgefallen. Für das erhaltene, fluoreszenzmarkierte Annexin A2m ergab sich ein Labelinggrad von 1:5, d.h. nur an durchschnittlich jedes fünfte Annexin-Molekül war ein Fluorophor gekoppelt.

Die Struktur und damit die Funktionalität eines Proteins kann durch eine kovalente Modifikation der Aminosäuren beeinträchtigt werden. Um eine Beeinflussung des Bindungsverhaltens der Proteine durch den angebrachten Fluoreszenzfarbstoff auszuschließen, wurden auch mit diesen Proteinen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Vesikelbindungstests durchgeführt. Die Bindung an POPC/POPS (4:1) Liposomen wurde mit SDS-Gelelektrophorese dokumentiert (Abb. 4.7). Nach 20 minütiger Inkubation der Proteine mit den Liposomen konnte sowohl für das fluoreszenzmarkierte Annexin A2t als auch für das Annexin A2m eine Membranbindung in Anwesenheit von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  festgestellt werden ( $P_{\text{Ca}}$ ). Allerdings war in beiden Fällen noch Protein im  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Überstand detektierbar. Nach Zugabe von 1 mM EGTA löste sich das monomere Annexin vollständig von der Membran und wurde nach Zentrifugation im Überstand erhalten ( $\ddot{U}_{\text{EGTA}}$ ). Im Fall des Annexin A2t konnte der Großteil des Proteins nach Zugabe von EGTA-Puffer im Überstand nachgewiesen werden ( $\ddot{U}_{\text{EGTA}}$ ). Jedoch blieben nach Abschätzung aus den SDS-Gelen ca. 10 % des Annexin A2t an die Liposomen assoziiert ( $P_{\text{EGTA}}$ ).

Um eine unspezifische Bindung auszuschließen, wurden ebenfalls Vesikelassays mit reinen POPC-Liposomen durchgeführt, wobei keine Annexin-Bindung

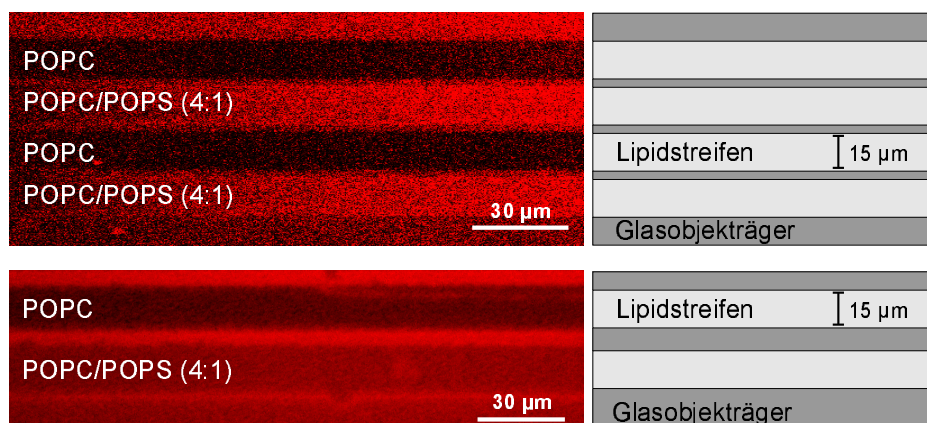




**Abb. 4.7:** SDS-Gele der Liposomenbindungstests von fluoreszenzmarkiertem Annexin A2t und A2m. Ü/P stehen jeweils für den Überstand bzw. das Pellet einer Zentrifugation. Ca/EGTA bezeichnen den jeweiligen Inkubationspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  bzw. EGTA, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 1 mM DTT).

beobachtet werden konnte. Sowohl das Annexin A2t als auch das Annexin A2m waren in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  ausschließlich im Überstand detektierbar.

Ein direkter Vergleich der spezifischen Annexinbindung an Membranen mit negativ geladenen Phospholipiden und Lipidschichten aus reinem POPC konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie erbracht werden. Durch Verwendung eines Lithographiestempels können Membranen unterschiedlicher Komposition nebeneinander auf einem Glasträger immobilisiert werden.



**Abb. 4.8:** Direkter Vergleich der Annexin-Bindung auf einer reinen POPC-Membran und einer POPC/POPS (4:1)-Membran mittels Fluoreszenzmikroskopie (**oben:** Annexin A2t, **unten:** Annexin A2m)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Probenpräparation und Aufnahmen von Simon Faiß, Johannes Gutenberg Universität Mainz

Die Membranstreifen entstehen, indem unilamellare Vesikel durch einen im Stempel vorgeformten Kanal gegeben werden, auf dem Glasträger adsorbieren und spreiten<sup>[113]</sup>. Mit Hilfe dieser Technik wurden 15 µm breite, nebeneinanderliegende Streifen aus POPC/POPS (4:1) und reinem POPC hergestellt und mit fluoreszenzmarkiertem Protein in Gegenwart von 1 mM CaCl<sub>2</sub> inkubiert. Die Messungen wurden freundlicherweise von Simon Faiß an der Johannes Gutenberg Universität Mainz durchgeführt. In Abbildung 4.8 ist deutlich erkennbar, daß auf der Lipiddoppelschicht mit negativ geladenem POPS Annexin gebunden hat, während der POPC-Streifen dunkel erscheint. Die heller erscheinenden Bereiche neben und zwischen den Streifen entstehen durch unspezifische Adsorption des Proteins auf der Glasoberfläche.

#### 4.1.4 Diskussion

Die Isolierung des Annexin A2 Heterotetramers aus Schweinemucosa basierte auf der Vorschrift von Gerke und Weber (1984)<sup>[43]</sup>. Der Proteinkomplex wurde nach mehreren Reinigungsschritten zu 99 % rein und mit einer Ausbeute von 45 mg pro 700 g Ausgangsmaterial erhalten. Das auf der Mono S-Säule abgetrennte unbekannte Protein besaß eine dem Annexin A2-Monomer entsprechende Masse und zeigte das für ein Annexin typische Ca<sup>2+</sup>-abhängige Bindungsverhalten. Vermutlich handelte es sich bei diesem unbekannten Protein um Annexin A1<sup>[18, 114]</sup>. Die Funktionalität des isolierten Annexin A2t wurde über einen Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Bindungstest gewährleistet, wobei eine unspezifische Interaktion mit Vesikeln ohne negativ geladene Phospholipide ausgeschlossen werden konnte.

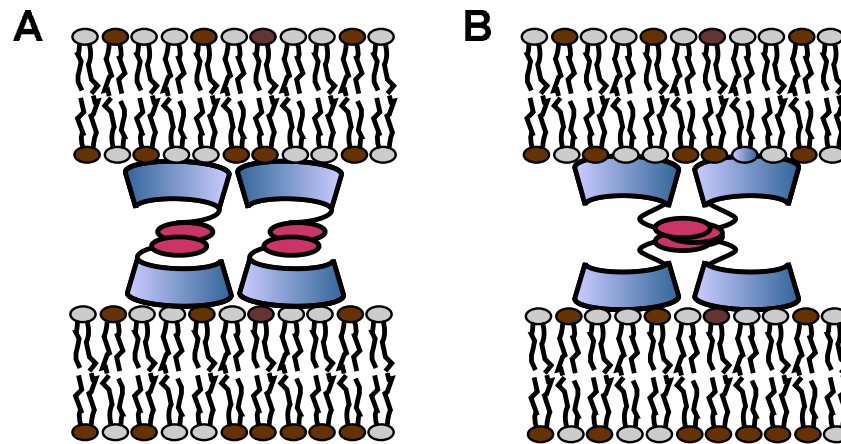
Der heterotetramere Annexin A2t-Komplex konnte nach einer Vorschrift von Gerke und Weber (1985) nach Denaturierung mit Harnstoff erfolgreich in seine Untereinheiten gespalten werden<sup>[42]</sup>. Mittels Western-Blot wurde gezeigt, daß sich kein p11 mehr in der Annexin A2m-Fraktion befand. Bei den in den folgenden Kapiteln beschriebenen Experimenten kann somit davon ausgegangen werden, daß reines Annexin A2m und kein Annexin A2t vorlag. Die Funktionalität des renaturierten Annexin A2m konnte über die charakteristische Ca<sup>2+</sup>-abhängige

Bindung an negativ geladene Phospholipide nachgewiesen werden.

Die im Blot durch den p11-spezifischen Antikörper detektierten höhermolekularen Aggregate bei ca. 45 bzw. 20 kDa beruhen auf einer oxidationsabhängigen Komplexbildung. Bei der ca. 20 kDa großen Bande handelt es sich vermutlich um ein p11-Dimer, wie es auch im nativen Zustand in der Zelle vorliegt<sup>[115]</sup>. Vor allem der freie Cystein Cys61-Rest im p11-Dimer ist für seine Oxidationsempfindlichkeit bekannt, wodurch sich auch Tetramere bilden können, was vermutlich auch die höhermolekulare Bande bei 45 kDa in der Spur des Annexin A2t erklärt. Unter Verwendung des Fluoreszenzlabeling Kits Texas-Red<sup>®</sup>-X der Firma Molecular Probes konnte sowohl das Annexin A2t als auch das Annexin A2m erfolgreich mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Die Funktionalität der Proteine wurde über die typische  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindung an PS-haltige Lipidvesikel nachgewiesen. Durch einen vergleichenden Test mit reinen POPC Vesikeln und über Fluoreszenzmikroskopie konnte eine unspezifische Assoziation an Lipidmembranen ausgeschlossen werden.

## 4.2 Molekulare Anordnung des Annexin A2 auf Lipidmembranoberflächen

Der heterotetramere Komplex des Annexin A2 und S100A10 (p11) ist nicht nur in der Lage an Membranen zu binden, sondern kann diese auch aggregieren. Aufgrund der Verbrückung sekretorischer Vesikel mit der Plasmamembran wird Annexin A2t eine Funktion in endo- und exocytotischen Prozessen zugeschrieben<sup>[4, 116]</sup>. Der Mechanismus dieser Membranverbrückung ist jedoch noch unklar. Cryoelektronenmikroskopische Aufnahmen von Lipidvesikeln, die durch eine Annexin A2t-Schicht verknüpft sind, zeigten deutlich drei Elektronendichtestreifen, die dem Proteinkomplex zugeordnet werden konnten<sup>[117]</sup>. Die Bildung dieser drei Elektronendichten läßt sich durch zwei verschiedene molekulare Anordnungen des Annexin A2t erklären. In dem ersten Modell verbindet das p11 zwei Annexin-Moleküle, so daß die beiden Membranbindungsstellen des Komplexes sich auf gegenüberliegenden Seiten befinden und so eine Verbrückung zweier Membranen vermitteln (Abb. 4.9 (A)). Im zweiten Aggregationsmodell sind beide Annexin-Monomere an die Membranoberfläche gebunden. Die Assoziation zweier Membranen erfolgt über eine Oktamerbildung des Annexin A2t, die über Wechselwirkungen zwischen den p11-Dimeren stabilisiert wird. Die beiden Modelle unterscheiden sich in der Höhe des im ersten Bindungsprozeß an die Oberfläche gebundenen Annexin A2t. Festkörperunterstützte Membranen eignen sich für die Fragestellung der Höhenbestimmung des ersten Bindungsprozesses besonders gut, da mit ihrer Hilfe die Proteinbindung an eine Membran unabhängig vom Aggregationsprozeß untersucht werden kann. Rasterkraftmikroskopische Messungen sollten im Rahmen dieser Arbeit einen genaueren Einblick in die Struktur der Annexin A2t-Membranbindung geben und über topographische Analysen die Grundlage für ein Modell des ersten Membranbindungsprozesses liefern. Dabei sollte vor allem ein Vergleich von heterotetramerem Annexin A2t und monomerem Annexin A2m Aufschluß über die molekulare Anordnung des Annexins auf einer Lipidoberfläche geben.



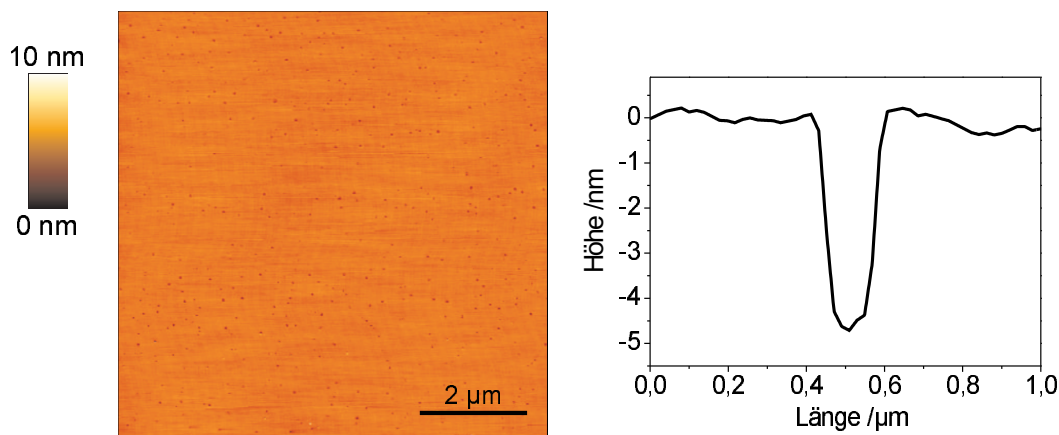
**Abb. 4.9:** Modelle der Annexin A2t-vermittelten Membranaggregation. **A** Die beiden Annexin-Moleküle eines Annexin A2t-Komplexes sind an gegenüberliegende Membranen gebunden. **B** Beide Annexin A2-Moleküle sind an dieselbe Lipidschicht gebunden. Die Membranen werden über eine Selbstassoziation des Annexin A2t verbrückt.

#### 4.2.1 Charakterisierung der verwendeten Lipidschichten

Für die Höhenbestimmung des membrangebundenen Annexin A2 wurden Lipidmembranen aus 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) und 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserin (DPPS) verwendet. Die Herstellung dieser Lipiddoppelschichten erfolgte über die in Abschnitt 3.3.1 beschriebene LB-Technik. Zunächst wurde eine DPPC-Monoschicht bei einem Oberflächendruck von 45 mN/m auf Glimmer immobilisiert. Über einen hydrophoben Übertrag wurde dann eine obere Membranschicht aus DPPC und DPPS im molaren Verhältnis 4:1 bei einem Oberflächendruck von 32 mN/m aufgebracht. Der Verlauf des Übertrages konnte durch eine kontinuierliche Kompression der Barrieren bzw. einer Abnahme der Gesamtfläche verfolgt werden.

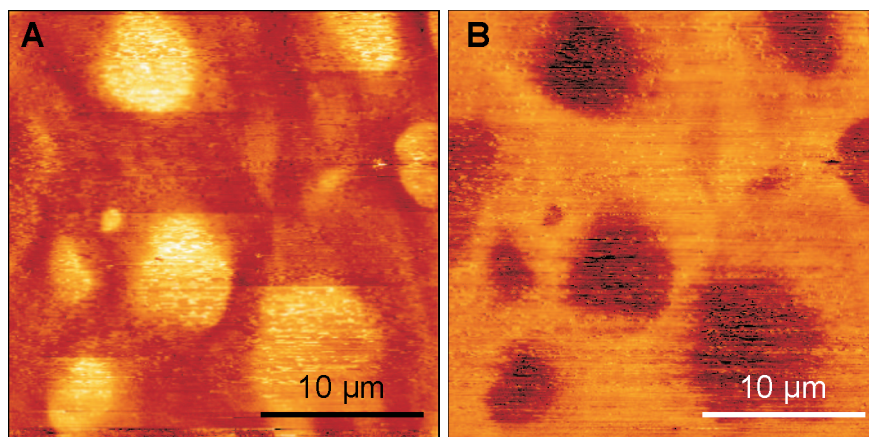
Für die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen wurde die festkörperunterstützte Membran in eine Teflonkammer überführt und in Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 1 mM DTT) vermessen. Die topographischen Aufnahmen einer DPPC/DPPS-Schicht zeigen weitgehend glatte Oberflächen ohne Höhenunterschiede (Abb. 4.10). Die einzigen Unregelmäßigkeiten bestehen aus ca. 50-150 nm großen Defekten, die in der Höhenin-

formation als kleine schwarze Punkte sichtbar sind. Ein Höhenprofil eines solchen Loches zeigt eine Tiefe von ca. 4.7 nm, die typischer Weise der Höhe einer Lipiddoppelschicht entspricht (Abb. 4.10). Die laterale Reibungsmikroskopie (*la-*



**Abb. 4.10:** A: Rasterkraftmikroskopisches Topographiebild einer mittels LB-Technik präparierten DPPC-DPPC/DPPS (4:1)-Schicht. Die kleinen schwarzen Punkte sind ca. 5 nm tiefe Defekte in der Lipiddoppelschicht, wie in dem nebenstehenden Linescan deutlich wird.

*teral force microscopy*, LFM) ermöglicht Materialunterschiede unabhängig von Höhendifferenzen darzustellen. In Abbildung 4.11 ist der Hin- und Rückscan einer LFM-Aufnahme einer DPPC/DPPS-Schicht gezeigt. Die Kontrastgebung erfolgt hier aufgrund der Torsion des *cantilevers*, wobei eine Torsion nach rechts durch eine hellere Farbe symbolisiert wird, während eine Torsion nach links in einer dunkleren Farbe erscheint. Daher erscheinen Hin- und Rückscan in inverser Farbgebung. In den LFM-Aufnahmen sind runde Domänen erkennbar, die eine größere Reibung aufweisen als ihre Umgebung. Ross et al. zeigten, daß diese Domänen überwiegend aus negativ geladenen DPPS-Lipiden bestehen und sich nur in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bilden<sup>[110]</sup>. Die Größe und Form der Domänen hängt von der jeweiligen Äquilibrationszeit des Lipidfilms an der Luft/Wasser-Grenzfläche ab, bevor dieser mit Hilfe der LB-Technik auf den Festkörper übertragen wird.

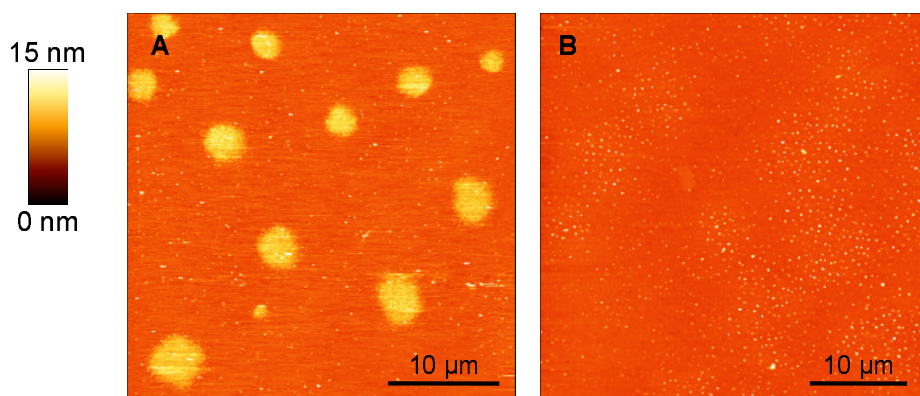


**Abb. 4.11:** Hin- und Rückscan einer LFM-Aufnahme einer DPPC/DPPS (4:1)-Oberfläche in Anwesenheit von 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Die hell bzw. dunkel hervorgehobenen Domänen deuten Bereiche höherer lateraler Reibung an. Diese Flächen bestehen überwiegend aus negativ geladenen DPPS-Lipiden.

#### 4.2.2 Membranbindung des heterotetrameren Komplexes

Die mittels LB-Übertrag hergestellte DPPC-DPPC/DPPS (4:1)-Lipiddoppelschicht wurde für 30 min mit Annexin A2t inkubiert. Aus einer Stammlösung von Annexin A2t wurde dabei soviel Protein zu der Probenlösung gegeben, daß eine Endkonzentration von mindestens  $0.3 \mu\text{M}$  erreicht wurde. Durch diese Vorgehensweise war eine maximale Bindung des Proteins auf der Oberfläche gewährleistet<sup>[78]</sup>. In Abbildung 4.12 (A) ist eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme der Probenoberfläche nach der Proteinzugabe dargestellt.

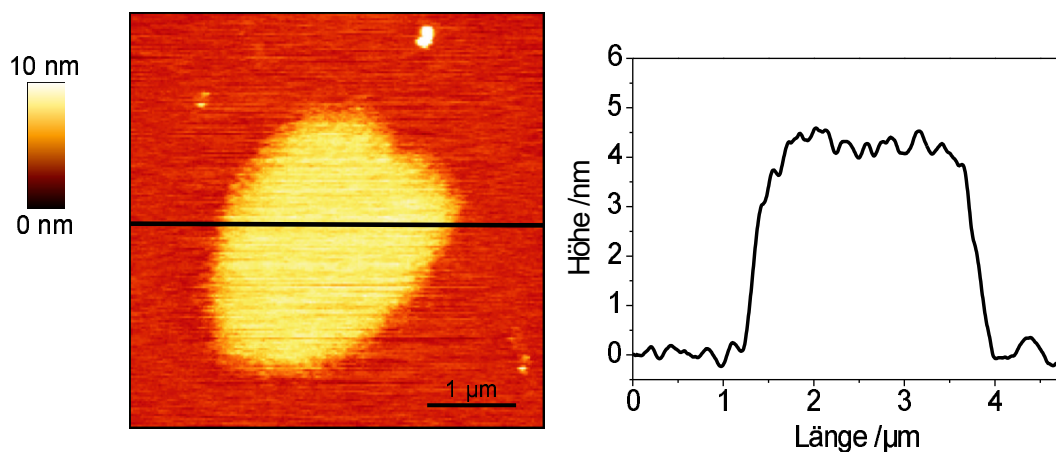
Es sind helle Domänen sichtbar, die in ihrer Größe, Form und Verteilung den in den LFM-Aufnahmen der jeweiligen Membranoberfläche beobachteten DPPS-reichen Domänen entsprechen. Die Proteinadsorption erfolgt offensichtlich spezifisch an den Bereichen, in denen das negativ geladene DPPS lokalisiert ist. Nach einem Pufferaustausch gegen 1 mM EGTA-haltigen Puffer (100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 20 mM Tris, pH 7.4) wurde auf den DPPS-reichen Domänen kein Protein mehr beobachtet (Abb. 4.12 (B)). Neben den großen Domänen sind auch kleine weiße Punkte erkennbar, die in Größe und Verteilung in den Aufnahmen ohne Protein den Defekten in der Lipidschicht zuzuordnen sind. Die in ihrer Höhe



**Abb. 4.12:** Topographische Aufnahmen einer DPPC/DPPS (4:1) - Oberfläche nach Zugabe von Annexin A2t in 1 mM  $\text{CaCl}_2$  - Puffer (A) und nach einem Pufferaustausch gegen 1 mM EGTA - Puffer (B).

stark variierenden Punkte (5-30 nm) sind einer unspezifischen Proteinadsorption in den Defekten zuzuschreiben.

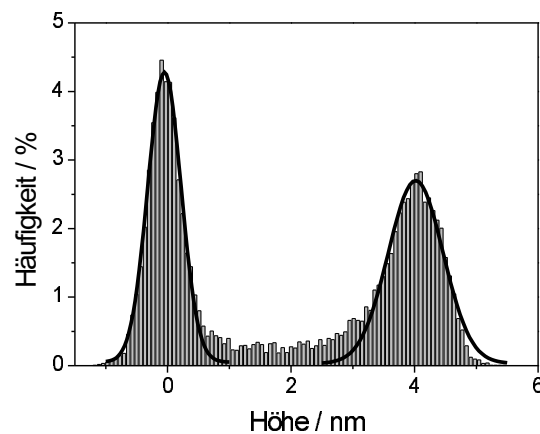
Die spezifische Bindung des Proteins auf den DPPS-reichen Domänen erfolgt in einer definierten Monolage, was eine gute Höhenbestimmung zulässt. In Abbildung 4.13 ist eine topographische Aufnahme einer einzelnen Proteindomäne dargestellt. Das nebenstehende Höhenprofil wurde entlang der durchgezogenen Linie im Topographiebild aufgenommen.



**Abb. 4.13:** Vergrößerung einer Annexin A2t - Domäne mit zugehörigem Höhenprofil. Das entlang der schwarzen Linie im Topographiebild aufgenommene Höhenprofil zeigt einen steilen Höhenanstieg am Rand der Proteindomäne.



Anhand dieses Höhenprofils kann man einen Höhenunterschied zwischen der Lipiddoppelschicht und der Annexin A2t-Monolage von ca. 4.5 nm ablesen. Der steile Anstieg der Höhenlinie zeigt eine klare Abgrenzung zwischen Bereichen mit und ohne Protein. Um eine genauere Höhenbestimmung vorzunehmen, wurden Histogrammanalysen einzelner Annexin-Domänen durchgeführt und ein Mittelwert aus allen ermittelten Höhenunterschieden gebildet. Ein typisches Histogramm ist in Abb. 4.14 dargestellt. Die resultierende Höhe des gebundenen Annexin A2t liegt bei  $(4.2 \pm 0.4)$  nm, bestimmt aus  $n = 16$  Domänen. Zur Höhenbestimmung wurden jeweils die Abstände der Peakmaxima herangezogen.

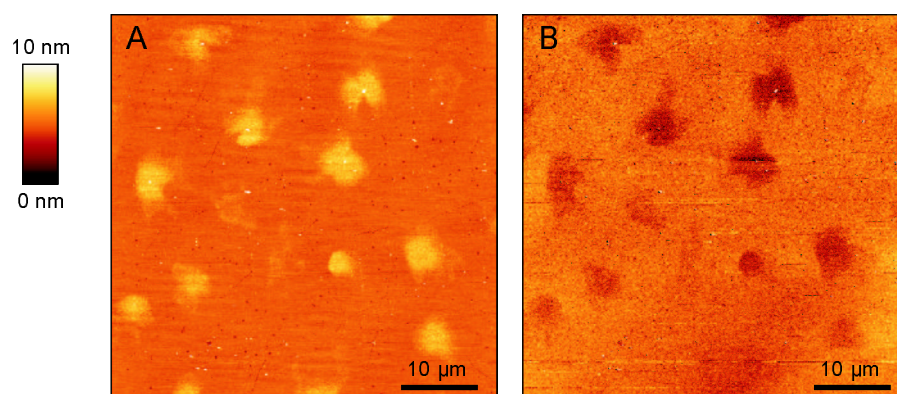


**Abb. 4.14:** Typische Histogrammhöhenanalyse einer Annexin A2t-Domäne. Zur übersichtlicheren Darstellung der Höhenunterschiede wurde der der Lipidoberfläche entsprechende Peak auf eine Höhe von 0 nm gesetzt. Die durchgezogenen Linien zeigen die jeweiligen Gauß-Anpassungen, wobei die Differenz ihrer Maxima zur Höhenbestimmung des Membran-gebundenen Annexin A2t diente.

### 4.2.3 Membranbindung des monomeren Annexin A2

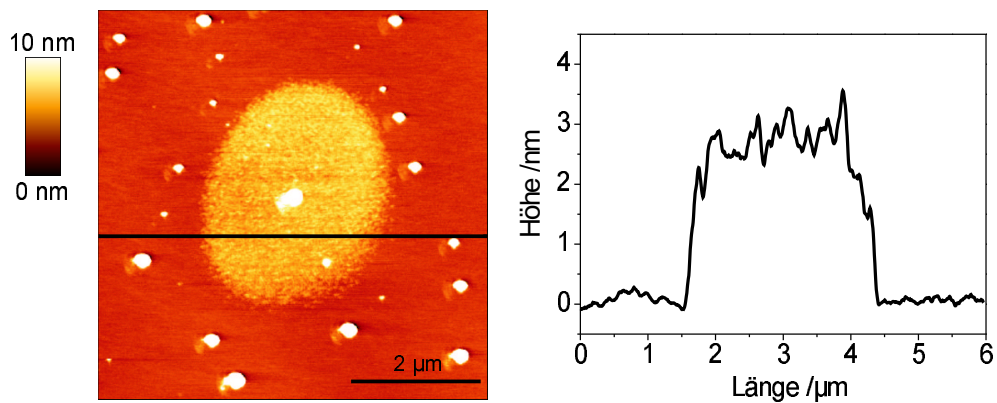
Membranbindungsexperimente und Höhenanalysen wurden in analoger Weise zu der beschriebenen Annexin A2t-Studie ebenfalls mit monomerem Annexin A2 durchgeführt. Die erhaltene Höheninformation soll als Bezugspunkt für die gefundene Höhe des Membran-gebundenen Annexin A2t dienen und so die vermutete molekulare Anordnung des Annexin A2t auf der Lipidschicht bestätigen. Eine

DPPC/DPPS (4:1) Oberfläche wurde 30 min mit 0.6  $\mu\text{M}$  Annexin A2m in Anwesenheit von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ) inkubiert. Eine topographische Aufnahme der Probe nach der Proteininkubation ist in Abbildung 4.15 (A) gezeigt. Die hellen, hohen Bereiche ähneln in ihrer Form und Verteilung den zuvor bei der Annexin A2t - Bindung beobachteten Domänen.

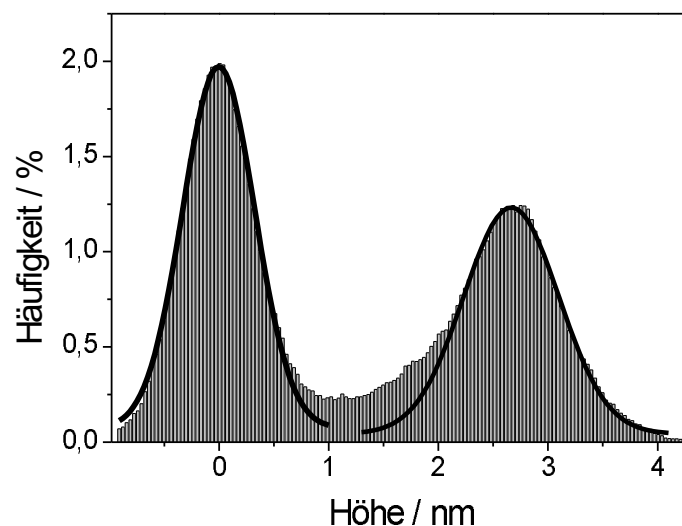


**Abb. 4.15:** Topographie (A) und Phasensignal (B) einer DPPC-DPPC/DPPS (4:1) Schicht nach 30-minütiger Inkubation mit 0.6  $\mu\text{M}$  A2m.

Das Annexin A2m assoziiert also ebenfalls wie der tetramere Komplex spezifisch an die vorgeformten DPPS-reichen Domänen. Abbildung 4.15 (B) zeigt das zugehörige Phasenbild der rasterkraftmikroskopischen Aufnahme. Es ist ein deutlicher Materialkontrast zwischen der Oberfläche der Lipiddoppelschicht und der adsorbierten Proteinlage sichtbar. Die Höhenanalyse des auf der Lipidoberfläche gebundenen Annexin A2m erfolgte in gleicher Weise wie zuvor für den tetrameren Komplex beschrieben. Ein Höhenprofil über eine einzelne Proteindomäne deutet einen Höhenunterschied von ca. 2.5 nm an (Abb. 4.16). Die in der Abbildung zu sehenden weißen Punkte sind Artefakte, die auf die Lipidschichtpräparation zurückzuführen sind und nicht beseitigt werden konnten. Vermutlich handelte es sich hierbei um auskristallisierte Lipide, die die Proteinbindung jedoch nicht beeinträchtigten. Die Histogrammanalyse mehrerer Annexin-Domänen ( $n=8$ ) lieferte eine Höhe von  $(2.8 \pm 0.7)$  nm. Ein typisches Histogramm mit zugehörigen Gaussanpassungen ist in Abbildung 4.17 gezeigt. Zur übersichtlicheren Darstellung des Höhenunterschieds wurde das Maximum des Lipidpeaks als Referenz auf eine Höhe von 0 nm gesetzt.



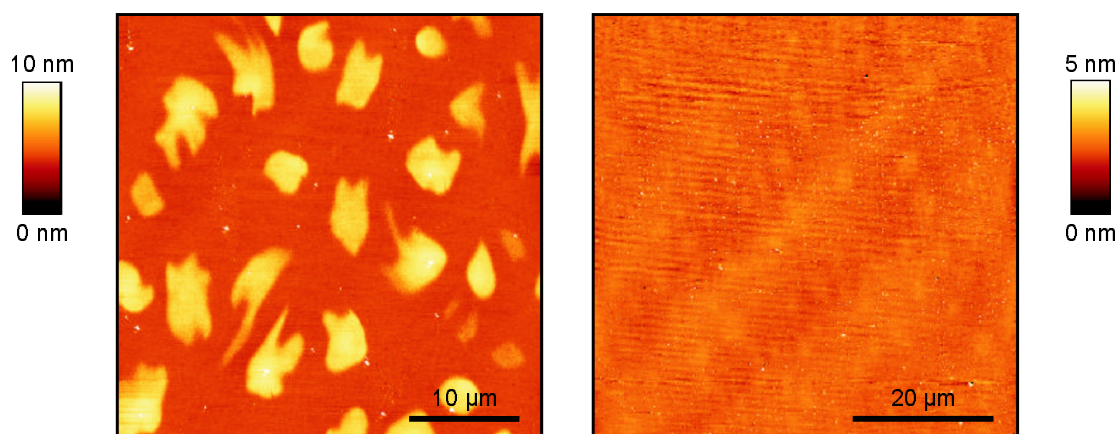
**Abb. 4.16:** Vergrößerung einer Annexin A2m-Domäne. Aus dem Höhenprofil entlang der in der Topographie gezeigten Linie läßt sich ein Höhenunterschied zwischen Lipidoberfläche und Annexin-Schicht von ca. 2.5 nm ablesen.



**Abb. 4.17:** Typische Histogrammanalyse einer Annexin A2m-Domäne. Die durchgezogenen Linien sind an die Daten angepasste Gausskurven. Der Höhenunterschied zwischen der Lipidoberfläche und dem Annexin A2m wird durch den Abstand der beiden Gausskurvenmaxima bestimmt.

Zur Gewinnung des monomeren Annexin A2 wurde das Annexin A2t zunächst in Gegenwart von Harnstoff denaturiert, wobei die Tertiärstruktur des Proteinkomplexes zerstört wird und die einzelnen Untereinheiten als Zufallsknäule vorliegen. Nach säulenchromatographischer Trennung des p11 und Annexin A2m können die Proteine einzeln durch Dialyse gegen Harnstoff-freien Puffer in ihre ursprüng-

liche Struktur zurückfalten. Um zu gewährleisten, daß das Annexin A2m nach seiner Renaturierung in die native Form und nicht in eine andere Tertiärstruktur gefaltet wurde, die die Höhenbestimmung aufgrund anderer Proteindimensionen verfälschen könnte, sollte die Reversibilität der Komplexbildung mit dem Proteinliganden p11 überprüft werden. Annexin A2m wurde im äquimolaren Verhältnis mit dem Liganden p11 gemischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen. Eine DPPC/DPPS (4:1) Schicht wurde mit  $0.4\text{ }\mu\text{M}$  des Proteingemisches für 30 min in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Puffer inkubiert (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ). Nicht gebundenes Protein wurde durch anschließenden Austausch der überstehenden Lösung mit Puffer entfernt. Eine topographische Aufnahme der Oberfläche nach der Proteininkubation ist in Abbildung 4.18 (A) gezeigt.

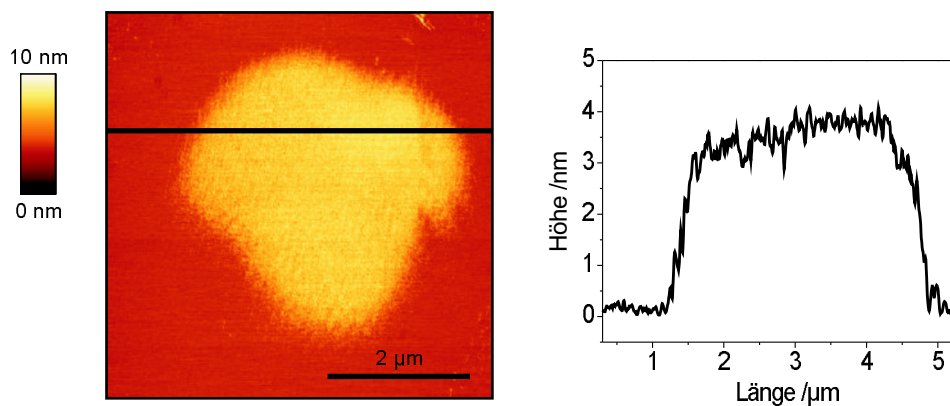


**Abb. 4.18:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen einer DPPC/DPPS (4:1)-Schicht nach der Inkubation mit aus den beiden Untereinheiten rekombinierten Annexin A2t in  $\text{CaCl}_2$ -haltigem Puffer (A). Nach einem Austausch der Lösung gegen EGTA-haltigen Puffer löste sich das Annexin von der Lipidoberfläche (B) (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ).

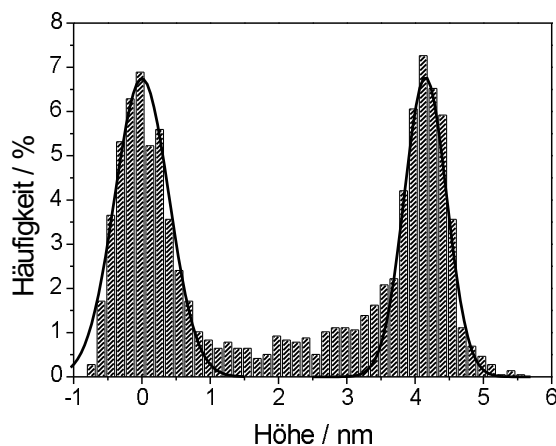
Die spezifische Adsorption an die DPPS-reichen Domänen ist deutlich erkennbar. Nach einem Austausch der Probenlösung gegen 1 mM EGTA-Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ) war kein Protein mehr auf

den DPPS-reichen Domänen zu beobachten, was die Reversibilität der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Bindung zeigte (Abb. 4.18 (B)). Daß die Domänen nicht die exakt runde Form aufweisen, läßt sich durch die Membranpräparation begründen. Der Spreitvorgang und die Äquilibrationszeit auf der Wasseroberfläche der Filmwaage beeinflussen die Größe und Form der entstehenden Domänen.

Abbildung 4.19 zeigt eine Vergrößerung einer Annexin-Domäne mit einem zugehörigen Höhenprofil. Analog zum nativen Annexin A2t erfolgt die Bindung des rekombinierten Komplexes in einer homogenen monomolekularen Schicht, deren Höhenunterschied zur Lipidschicht wie aus dem Höhenprofil ersichtlich etwa 4 nm beträgt. Die genaue Höhe des rekombinierten Annexin A2t-Komplexes wurde ebenfalls durch Histogrammanalysen einzelner Proteindomänen ( $n = 17$ ) bestimmt. Der ermittelte Höhenunterschied zwischen Membranoberfläche und Proteinschicht beträgt  $(4.0 \pm 0.4)$  nm und entspricht somit gut dem für natives Annexin A2t gefundenen Wert. Die Rekombination zu dem heterotetrameren Komplex A2t durch Wechselwirkung von renaturiertem monomerem Annexin A2 und p11 konnte somit erfolgreich gezeigt werden.



**Abb. 4.19:** Vergrößerung einer Domäne von rekombiniertem Annexin A2t. Aus dem Höhenprofil (rechts) entlang der in der Topographie (links) gezeigten Linie läßt sich ein Höhenunterschied zwischen Lipidoberfläche und Annexin-Schicht von ca. 4 nm ablesen.



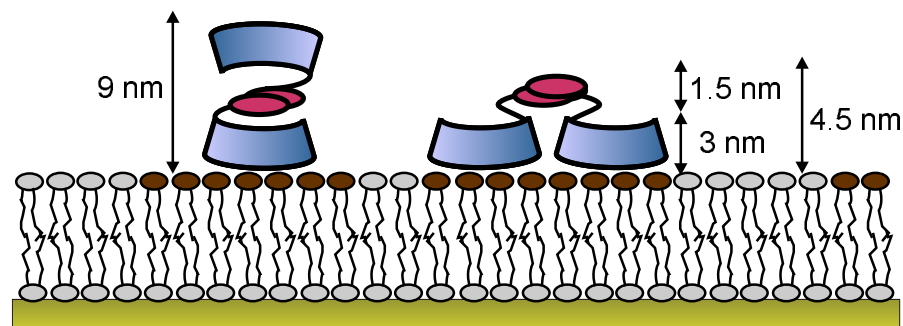
**Abb. 4.20:** Typische Histogrammanalyse des aus den beiden Untereinheiten renaturierten Annexin A2t-Komplexes. Zur übersichtlicheren Darstellung wurde der der Lipidschicht-zugehörige Peak auf 0 nm gesetzt.

#### 4.2.4 Diskussion

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Annexin A2 ist eine Ausnahme innerhalb der Annexin Familie, da es *in vivo* überwiegend mit seinem spezifischen Protein-Liganden p11 assoziiert vorliegt. Der resultierende heterotetramere Komplex ist bei einer üblichen zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von ca. 100 nM an die Plasmamembran oder frühe Endosomen gebunden. Neben der für alle Annexine typischen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Membranbindung sind Annexin A2t, A1 und A7 in der Lage Membranen miteinander zu verknüpfen, wobei nur im Fall des Annexin A2t eine physiologische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration für die Aggregation von Vesikeln bzw. chromaffinen Granulae ausreichend ist<sup>[26]</sup>. Durch eine Verknüpfung z.B. der Plasmamembran mit sekretorischen Vesikeln soll Annexin A2t an endo- und exocytotischen Prozessen beteiligt sein<sup>[4, 116]</sup>. Die Verknüpfung zweier Lipidschichten ist auch für die Ausbildung sog. *tight junctions* zwischen Epithel- oder Endothelzellen notwendig. Lee et al. zeigten, daß Annexin A2t an der Stabilisierung der Zell-Zell-Verknüpfungspunkte beteiligt ist<sup>[118]</sup>.

In cryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen von durch Annexin A2t aggregierten Lipidvesikeln und chromaffinen Granulae ist deutlich eine Annexin-Schicht in den Bereichen der Membrankontakte zu erkennen. Im Fall des An-

nexin A2t besteht die Proteinschicht aus drei Elektronendichtestreifen, während bei monomerem Annexin A2 und A1 nur zwei Elektronendichten zu beobachten sind. Auffällig ist, daß die Annexin-Moleküle nicht einzeln auf der Membran verteilt sind, sondern laterale Cluster bilden, an denen die Membranaggregation stattfindet. Für den Mechanismus der Membranaggregation bzw. die molekulare Anordnung der Annexin A2t-verbrückenden Schicht werden zwei unterschiedliche Modelle diskutiert (Abb. 4.21).



**Abb. 4.21:** Mögliche Anordnungen des Annexin A2t auf einer DPPC/DPSP-Membranoberfläche. Die Höhenangaben bezeichnen die aus den kristallographischen Daten erwarteten Höhendifferenz.

Lambert et al. deuteten die drei Elektronendichten als eine Stapelanordnung des tetrameren Komplexes, wobei die beiden Annexin-Moleküle eines Heterotetramers mit ihrer konvexen Seite an gegenüberliegende Lipidschichten gebunden sind und über Wechselwirkungen der N-Termini mit dem p11-Dimer zusammengehalten werden<sup>[117]</sup>. Die aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestimmte Breite der Annexin A2t-Schicht von ca. 9 nm entspricht der aufgrund von kristallographischen Daten ermittelten Höhe einer solchen Anordnung. Die zweite Möglichkeit der Membranverknüpfung ist über eine Selbstassoziation des Annexin A2t, die z.B. durch Interaktionen der p11-Dimere vermittelt wird<sup>[25]</sup>. In dieser Anordnung sind beide Annexin-Moleküle mit ihrer konvexen Seite an die Membran gebunden, so daß der Komplex in Anbetracht kristallographischer Daten eine Höhe von ca. 4,5 nm hätte. Auch eine solche Anordnung könnte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen drei Elektronenstreifen hervorrufen, da je

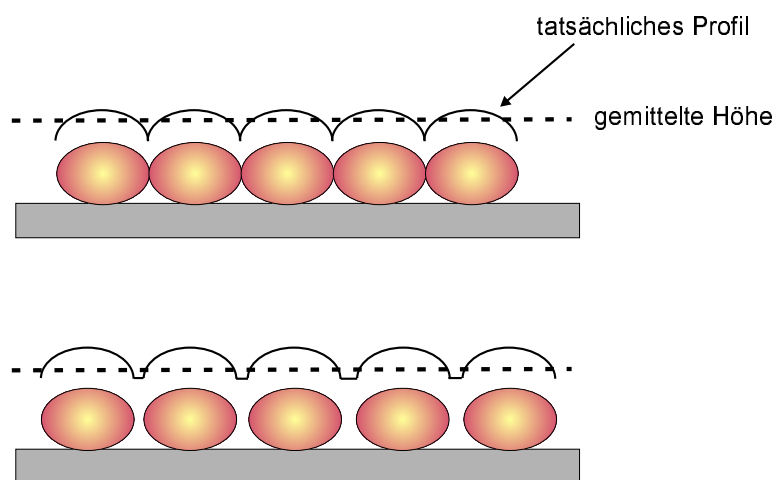
nach Orientierung der p11-Moleküle ihre Elektronendichten nicht einzeln aufzulösen wären. Allerdings favorisieren diesbezügliche Simulationen der beiden möglichen Annexin A2t-Anordnungen, die auf Kristallstrukturen der Annexin-Kerndomäne und des p11-Dimers beruhen, die in Abbildung 4.9 (A) dargestellte Stapelanordnung<sup>[23]</sup>.

Mittels der LB-Technik konnten erfolgreich Doppelschichten mit den Gelphasenlipiden DPPC und DPPS hergestellt werden. Die Verwendung von DPPC-DPPC/DPPS (4:1) Lipidschichten für die Höhenanalyse der gebundenen Proteine hat zwei entscheidende Vorteile. Zum einen befinden sich die verwendeten Lipide bei Raumtemperatur in der Gelphase, so daß die Lipidschicht bei den gewählten Bedingungen eine dichte, geordnete Packung aufweist. Diese Membranstruktur sorgt für eine feste Oberfläche, die bei rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen nur geringer Deformation durch die Meßspitze unterliegt. Dies ist für eine möglichst genaue Höhenbestimmung von auf der Oberfläche gebundenen Proteinen entscheidend. Ein weiterer Vorteil der gewählten Lipidzusammensetzung DPPC/DPPS (4:1) ist die Ausbildung runder, PS-reicher Domänen in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Ross et al. konnten zeigen, daß es sich bei den in den LFM-Aufnahmen sichtbaren rigideren Domänen, um eine laterale Anreicherung des negativ geladenen DPPS handelt<sup>[110]</sup>. Aufgrund dieser vorgeformten Bindungsplätze kann das Annexin in einer definierten Schicht an die Membran binden. Durch statistische Mittelung des Topographiekontrastes über eine so relativ große Fläche minimiert sich der Fehler der Höhenbestimmung.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen eine Höhe von  $(4.2 \pm 0.4)$  nm für den Membran-gebundenen Annexin A2t-Komplex, was gut mit dem zweiten vorgestellten Modell übereinstimmt. Die Abweichung von 0.3 nm von dem aus kristallographischen Daten erwarteten Höhenunterschied zur Lipidmembran ist zum einen auf leichte Verformungen der Proteine durch die Meßspitze zurückzuführen und liegt zum anderen in der durchgeführten Auswertung an sich. Die Belegung der Oberfläche einer DPPS-reichen Domäne mit Proteinmolekülen ist immer kleiner eins, so daß bei der zur Höhenbestimmung verwendeten Histogrammanalyse



auch über Bereiche ohne Protein gemittelt wird. Dies hat automatisch eine leichte Unterbestimmung in den Höhendifferenzen zur Folge, was in Abbildung 4.22 schematisch dargestellt ist. Wenn die Spitze in die Zwischenräume der adsorbierten Objekte nicht ganz eindringt und die tatsächlichen Höhenunterschiede nicht aufgelöst werden können, führt dies im Mittel automatisch zu einer Unterbestimmung der eigentlichen Höhe. Dies wirkt sich umso mehr aus, je geringer die Oberflächenbelegung mit adsorbierten Teilchen ist.



**Abb. 4.22:** Schematische Darstellung der Unterbestimmung einer Höhendifferenz in Abhängigkeit der Belegungsdichte.

In guter Übereinstimmung zu einer rasterkraftmikroskopischen Studie von Janshoff et al., die für Annexin A1 eine Höhe von  $(3.2 \pm 0.3)$  nm bestimmten<sup>[119]</sup>, wurde in dieser Arbeit der Höhenunterschied von Annexin A2m zur Lipidmembranoberfläche zu  $(2.8 \pm 0.7)$  nm bestimmt. Kristallographische Daten der C-terminalen Kerndomäne des Annexin A2 zeigen eine Höhe von ca. 3 nm, was die gefundene Höhe bestätigt<sup>[120]</sup>. Auch in der Höhenbestimmung des Annexin A2m zeigt sich analog zum Annexin A2t eine leichte Unterbestimmung der Höhe, was ebenfalls auf zuvor genannte Gründe zurückzuführen ist. Die für das Annexin A2m bestimmte Höhe bietet einen guten Bezugspunkt für die Deutung der molekulare Anordnung des Annexin A2t. Ein Höhenvergleich der beiden Proteine zeigt eine Differenz von 1.4 nm, die unter Berücksichtigung der kristallographischen

Abmessungen der Proteine nur mit der in Abbildung 4.9 (B) gezeigten Anordnung erklärt werden kann. Mit dem p11-verwandte S100-Proteine haben in ihrer dimeren Form Abmessungen von ca.  $3\text{ nm} \times 3\text{ nm} \times 3\text{ nm}$ <sup>[121, 122]</sup>. Eine nebeneinander liegende Anordnung der beiden p11-Moleküle würde genau die Höhendifferenz zwischen dem Annexin A2m und A2t hervorrufen.

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen eindeutig, daß im ersten Bindungsprozeß beide Annexin-Moleküle des Annexin A2t an die Membran assoziieren. Ob die Membranaggregation auf eine Oktamerbildung über Wechselwirkungen zwischen den p11-Dimeren vermittelt wird oder Konformationsänderungen die zweite Membranbindung ermöglichen, kann mit den hier vorgestellten Experimenten nicht beantwortet werden. Ein Indiz für die über das p11-Dimer vermittelte Oktamerbildung ist die literaturbekannte Tendenz des p11 zur Selbstassoziation in Form einer Tetramerbildung<sup>[115]</sup>, wie sie auch in Abschnitt 4.1.2 beschrieben wurde. Interessanterweise wird die Aggregationseigenschaft des Annexin A2t durch Phosphorylierung durch die Protein Kinase C inhibiert, während die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindung unbeeinflusst bleibt<sup>[123]</sup>. Diese unabhängige Regulierung läßt sich durch zwei in ihrer Art verschiedene Interaktionen für die Membranbindung bzw. -aggregation erklären. In einer Mutationsstudie, in der die im N-Terminus des Annexin A2 befindlichen Reste Ser-11 und Ser-25 durch die negativ-geladene Glutaminsäure ausgetauscht wurden, konnte die so vorgetäuschte Phosphorylierung systematisch untersucht werden<sup>[21]</sup>. Die Ergebnisse legen eine durch Phosphorylierung induzierte Konformationsänderung im N-terminalen Bereich des Annexin A2 nahe, die eine Membranaggregation beeinträchtigt. Ob durch die Konformationsänderung eine Annexin-Annexin-Interaktion unterbunden wird oder ob eine zweite im N-Terminus befindliche Membranbindungsstelle, ähnlich wie beim Annexin A1, blockiert wird, bleibt jedoch unklar.

## 4.3 Laterale Organisation des Annexin A2

Obwohl eine genaue Funktion des Annexin A2 *in vivo* noch nicht geklärt ist, gibt es zahlreiche Prozesse, für die eine Beteiligung des Annexin A2 nachgewiesen werden konnte. So stabilisiert Annexin A2t z.B. die Verknüpfung des Cytoskeletts mit der Plasmamembran, wobei es an sog. Actin - Bündelungspunkten in lateralen Aggregaten organisiert ist<sup>[27]</sup>. Interessanterweise scheint diese laterale Rekrutierung in Zusammenhang mit einer Membranstruktur aufzutreten, die reich an Cholesterin und anderen sog. *raft*-Lipiden und Proteinen ist. Tatsächlich zeigten *in vitro*-Studien, daß Annexin A2t in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der Lage ist, detergentresistente Membranfragmente (DRMs), über die ursprünglich *raft*-typische Moleküle definiert wurden, zu größeren Plattformen zusammenzuführen<sup>[37]</sup>. Eine weitere Funktion des Annexin A2t ist die im vorherigen Abschnitt beschriebene Verknüpfung zellulärer Membranen. Auch an diesen Verknüpfungspunkten ist das Annexin A2t nicht als Einzelmolekül, sondern in lokal konzentrierter Form als Ensemble für die Verbrückung zweier Membranen verantwortlich<sup>[117, 124]</sup>. Da in allen Funktionen eine laterale Organisation des Annexin A2t auf der Lipidmembran eine entscheidende Rolle zu spielen scheint, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Anordnung des Annexin A2t auf einer Lipidmembran visualisiert und charakterisiert werden.

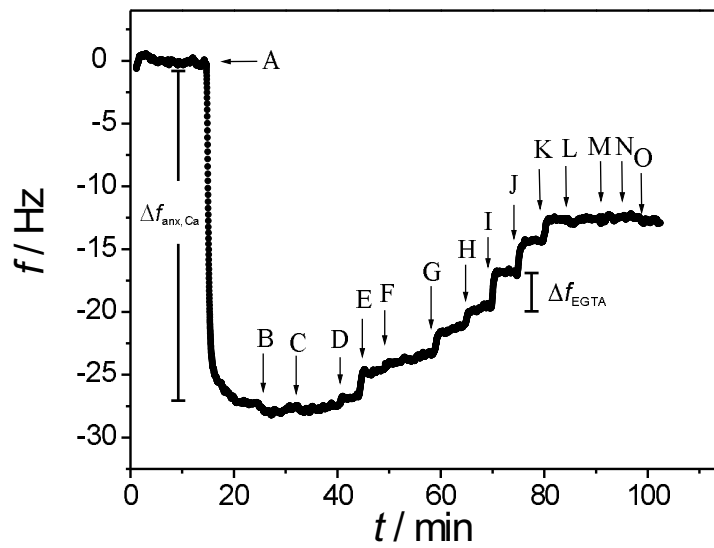
Die Komplexbildung des Annexin A2 mit dem Proteinliganden p11 hat offensichtlich einen großen Einfluß sowohl auf die biochemischen Eigenschaften als auch auf die Funktionen des Annexin A2 *in vivo*. Während der heterotetramere Komplex an zellulären Membranen lokalisiert ist, befindet sich das monomere Annexin überwiegend im Cytosol der Zelle. Da die laterale Organisation des Annexins auf der Membranoberfläche für die zellulären Funktionen des Proteins von entscheidender Bedeutung zu sein scheint, soll im Rahmen dieser Arbeit ein Vergleich zwischen der Verteilung von monomerer und heterotetramerer Form des Annexins auf Membranoberflächen erstellt werden.

### 4.3.1 Reversibilität der Annexin A2m - Membranbindung

Die Quarzmikrowaage-technik ermöglicht, das Bindungsverhalten des Annexin A2 in Abhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration zu untersuchen. Für Annexin A2t wurden über  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Titrationsexperimente sowohl der Adsorptions- als auch der Desorptionsprozeß an festkörperunterstützte OT-POPC/POPS-Membranen von Ross charakterisiert<sup>[35,78]</sup>. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigten eine signifikante Hysterese zwischen Adsorptions- und Desorptionskurve sowie einen zweistufigen Prozeß der Annexin A2t-Bindung bei steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Das Auftreten von zwei Wendepunkten wurde auf zwei unterschiedliche Annexin-Populationen zurückgeführt, die an hoch- bzw. niedrig-affine Bindungsplätze der Lipidmembran gebunden waren. Ausgehend von diesen Ergebnissen entwickelten Ross et al. ein Modell für die Annexin A2t-Membranbindung, das auf einer lateralen Organisation der negativ-geladenen Phospholipide durch das Annexin A2t basiert<sup>[35]</sup>. Es stellte sich nun die Frage, ob das monomere Annexin A2m ebenfalls in der Lage wäre POPS-Lipide lateral zu aggregieren, was sich nach dem vorgeschlagenen Modell ebenfalls in einer Hysterese zwischen Adsorptions- und Desorptionsprozeß äußern sollte.

Für die Titrationsexperimente, in denen die Annexin-Konzentration konstant gehalten wird, während die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration variiert wird, gibt es prinzipiell zwei Vorgehensweisen. In den sog. EGTA-Titrationen wird das Annexin in Anwesenheit von  $\text{CaCl}_2$  an die Lipidmembran gebunden und durch schrittweise Zugabe EGTA-haltiger Lösung in Folge der  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexierung von der Oberfläche gelöst. Alternativ kann auch eine EGTA-haltige Proteinlösung vorgelegt und durch schrittweise Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Bindung des Annexins an die Oberfläche verfolgt werden. Diese Vorgehensweise wird im Folgenden als  $\text{Ca}^{2+}$ -Titration bezeichnet. Für den heterotetrameren Komplex des Annexins wurden diese Titrationskurven bereits eingehend untersucht<sup>[78]</sup>. Für das monomere Annexin A2m sollen die Ergebnisse der reversiblen Membranbindung im Folgenden vorgestellt werden, um anschließend einen Vergleich zu den Daten des Annexin A2t herzustellen.

**EGTA - Titration.** In einem EGTA - Titrationsexperiment wird das Annexin A2m ( $c \geq 0.3 \mu\text{M}$ ) zunächst in Gegenwart von  $1 \text{ mM CaCl}_2$  in Puffer ( $20 \text{ mM Tris/HCl}$ ,  $\text{pH } 7.4$ ,  $100 \text{ mM NaCl}$ ,  $1 \text{ mM NaN}_3$ ) an eine festkörperunterstützte POPC/POPS (4:1)-Membran gebunden und durch schrittweise Zugabe EGTA-haltiger Pufferlösung ( $20 \text{ mM Tris/HCl}$ ,  $\text{pH } 7.4$ ,  $25 \text{ mM EGTA}$ ,  $100 \text{ mM NaCl}$ ,  $1 \text{ mM NaN}_3$ ) wieder von der Oberfläche abgelöst. Eine typische Titrationskurve eines solchen Experimentes ist in Abbildung 4.23 dargestellt.



**Abb. 4.23:** Zeitabhängige Resonanzfrequenzänderung einer EGTA - Titration von Annexin A2m mittels Quarzmikrowaage-technik. Das Annexin A2m wird in Anwesenheit von  $1 \text{ mM CaCl}_2$  zu einer OT-POPC/POPS (4:1) Schicht gegeben (A) und durch schrittweise Zugabe eines EGTA - haltigen Puffers ( $25 \text{ mM}$ ) von der Oberfläche gelöst. Die freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen sind B:  $7.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , C:  $5.4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , D:  $3.4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , E:  $1.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , F:  $8.9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ , G:  $3.1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ , H:  $4.1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ , I:  $2.1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ , J:  $1.4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ , K:  $1.1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ , L:  $8.8 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ , M:  $7.3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ , N:  $5.2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ , O:  $3.3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$  ( $20 \text{ mM Tris/HCl}$ ,  $\text{pH } 7.4$ ,  $100 \text{ mM NaCl}$ ,  $1 \text{ mM NaN}_3$ ).

Zu Beginn der Titration ist eine Frequenzerniedrigung zu beobachten, die durch die Adsorption des Annexins an die Oberfläche hervorgerufen und als  $\Delta f_{\text{anx,Ca}}$  bezeichnet wird. Nach Zugabe EGTA - haltiger Lösung kommt es zu einer Frequenzerhöhung ( $\Delta f_{\text{EGTA}}$ ), die aus der Desorption des Proteins resultiert.

Geht man davon aus, daß nach der Zugabe des Annexin A2m zu Beginn des Experimentes eine maximale Belegung der Oberfläche erreicht wird, so kann man den relativen Belegungsgrad ( $\Theta$ ) für unterschiedliche freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen über die beobachteten Frequenzänderungen bestimmen:

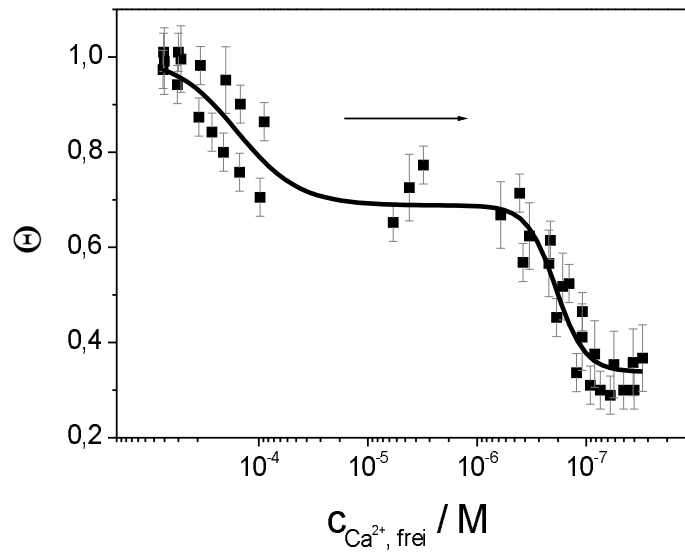
$$\Theta(\text{Ca}^{2+}) = \frac{\Delta f_{\text{ann,Ca}} + \Delta f_{\text{EGTA}}}{\Delta f_{\text{ann,Ca}}} \quad (4.2)$$

Bei der Bestimmung der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration müssen die Dissoziationskonstanten sowohl des Protonierungsgleichgewichts des EGTA als auch die der Gleichgewichtsreaktion von der Chelatisierung zweiwertiger Ionen berücksichtigt werden<sup>[125]</sup>. Zur Berechnung der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde ein in Mathcad 2001 geschriebenes Programm verwendet. Trägt man die ermittelten Belegungsgrade gegen die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf, erhält man die Titrationskurven der Annexin A2m-Membranbindung in Abhängigkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes (Abb. 4.24).

Man kann deutlich einen zweistufigen Prozeß für die Desorption des Annexin A2m von der Oberfläche beobachten, dessen Verlauf sich mit der Hill-Gleichung anpassen läßt (durchgezogene Linie). Mit Hilfe der Hill-Gleichung lassen sich kooperative Adsorptionsprozesse beschreiben, wobei berücksichtigt wird, daß die Bindung eines ersten Liganden die Bindung des zweiten Liganden beeinflusst. Da Annexine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an Membranen binden, ist der Belegungsgrad  $\Theta$  nicht nur von der Konzentration des Proteins, sondern auch von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängig. Da in den Titrationsexperimenten die Annexin-Konzentration konstant bleibt, kann der Belegungsgrad in Abhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beschrieben werden. Berücksichtigt man zudem, daß der Desorptionsprozeß in zwei Stufen verläuft, ergibt sich die Hill-Gleichung zu:

$$\Theta = \Theta_0 + (\Theta' - \Theta_0) \frac{c_{\text{Ca}}^n}{(K_{0.5})^n + c_{\text{Ca}}^n} + (1 - \Theta') \frac{c_{\text{Ca}}^{n'}}{(K'_{0.5})^{n'} + c_{\text{Ca}}^{n'}} \quad (4.3)$$

$\Theta'$  gibt den Belegungsgrad nach der ersten Desorptionsstufe und  $\Theta_0$  den Be-



**Abb. 4.24:**  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Desorption des Annexin A2m von einer OT-POPC/POPS (4:1)-Doppelschicht. Der relative Belegungsgrad ist gegen die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufgetragen, wobei die maximale Belegung nach der ersten Annexin A2m-Zugabe auf 1 festgelegt wurde. Die Bindung des Proteins erfolgte in 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ).

ungsgrad am Ende der Titration an. Die mittleren Dissoziationskonstanten für den ersten und zweiten Desorptionsprozeß werden mit  $K'_{0.5}$  und  $K_{0.5}$  bezeichnet, die Hill-Koeffizienten entsprechend mit  $n$  und  $n'$ . Die Anpassung der Titrationsdaten mit Gleichung 4.3 ergeben die in der folgenden Tabelle angegebenen Parameter.

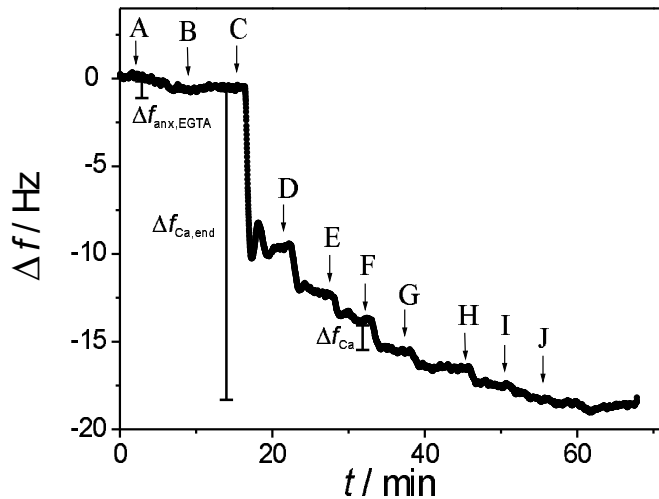
**Tab. 4.1:** Intermediärer und finaler Belegungsgrad, Dissoziationskonstanten und Hill-Koeffizienten der Annexin A2m-Desorption von OT-POPC/POPS (4:1)-Membranen.

$\Theta_0$	$K_{0.5} / \text{nM}$	$n$	$\Theta'$	$K'_{0.5} / \mu\text{M}$	$n'$
$0.35 \pm 0.03$	$199 \pm 33$	$2.6 \pm 1.0$	$0.71 \pm 0.04$	$150 \pm 40$	$1.6 \pm 0.6$

Mit einem Hill-Koeffizienten von etwa  $n = 3$  handelt es sich bei der zweiten Desorption um einen kooperativen Prozeß, während der erste Desorptionsprozeß einen weniger kooperativen Charakter aufweist. Der Belegungsgrad nach der er-

sten Desorption von  $\Theta' = 0.71$  zeigt, daß im ersten Schritt mit einem  $K'_{0.5}$  von  $(150 \pm 40) \mu\text{M}$  ca. 30 % des an die Lipidoberfläche gebundenen Proteins desorbieren. Nach dem zweiten Prozeß, in dem weitere 35 % des Annexin A2m mit einer Dissoziationskonstante von  $K_{0.5} = (199 \pm 33) \text{nM}$  von der Membran desorbieren, bleiben noch ca. 35 % ( $\Theta_0 = 0.35 \pm 0.03$ ) des Annexins irreversibel an die Membran gebunden.

**Ca<sup>2+</sup> - Titration.** Abbildung 4.25 zeigt eine typische Bindungskurve des Annexin A2m bei schrittweiser Zugabe von Ca<sup>2+</sup>-haltiger Lösung. Zunächst wird Annexin A2m ( $c \geq 0.3 \mu\text{M}$ ) in EGTA-haltiger Lösung (0.1 mM EGTA, 100 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 20 mM Tris, pH 7.4) zu einer festkörperunterstützten OT-POPC/POPS (4:1) Membran gegeben (A), was eine geringfügige Abnahme der Resonanzfrequenz ( $\Delta f_{\text{anx,EGTA}}$ ) zur Folge hat. Bei schrittweiser Zugabe eines 25 mM CaCl<sub>2</sub>-Puffers (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>) erniedrigt sich stufenweise die Frequenz ( $\Delta f_{\text{Ca}}$ ) bis schließlich bei einer freien Calciumkonzentration von 1.7 mM (J) keine weitere Frequenzerniedrigung mehr zu beobachten ist.



**Abb. 4.25:** Zeitabhängige Änderung der Resonanzfrequenz eines Ca<sup>2+</sup>-Titrations-experiments mit Annexin A2m mittels Quarzmikrowaagetechnik. Annexin A2m wird in EGTA-haltiger Lösung zu einer OT-POPC/POPS (4:1)-Doppelschicht gegeben (A). Die schrittweise Zugabe eines 25 mM Ca<sup>2+</sup>-Puffers führt zu einer stufenweisen Erniedrigung der Resonanzfrequenz. B:  $4.7 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ , C:  $5.1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ , D:  $2.5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ , E:  $1.1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , F:  $2.8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , G:  $4.4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , H:  $7.7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , I:  $1.2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ , J:  $1.7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>).

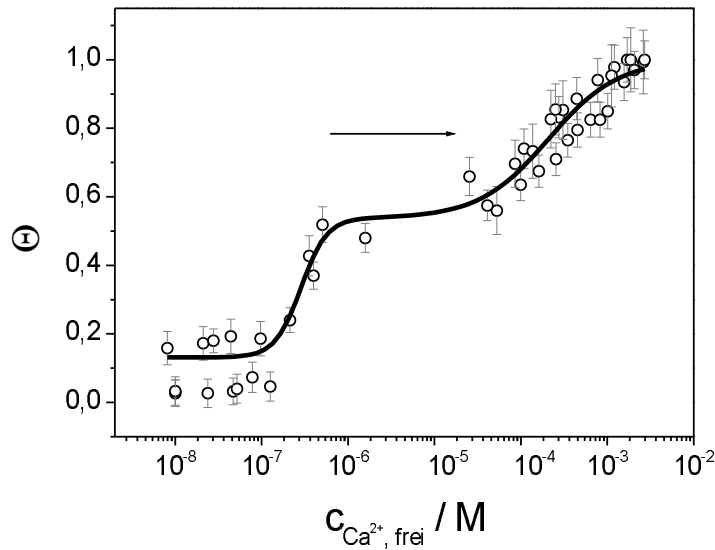


Der relative Belegungsgrad ( $\Theta$ ) läßt sich in Abhängigkeit der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration darstellen, wobei der Belegungsgrad über die Frequenzänderungen bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe mit folgender Formel bestimmt wird:

$$\Theta(\text{Ca}^{2+}) = \frac{\Delta f_{\text{anx,EGTA}} + \Delta f_{\text{Ca}}}{\Delta f_{\text{anx,EGTA}} + \Delta f_{\text{Ca,end}}} \quad (4.4)$$

$\Delta f_{\text{Ca,end}}$  bezeichnet dabei die Summe aller Frequenzänderungen der einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugaben. Der relative Belegungsgrad  $\Theta$  gibt also den Anteil der Oberflächenbelegung bezogen auf die maximale Bindung des Proteins am Ende des Titrationsexperimentes ( $\Delta f_{\text{anx,EGTA}} + \Delta f_{\text{Ca,end}}$ ) an.

In Abbildung 4.26 ist der relative Belegungsgrad in Abhängigkeit der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dargestellt. Analog zu der EGTA-Titrationskurve ist ein zweistufiger Prozeß erkennbar, so daß die Daten ebenfalls mit Gleichung 4.3 angepaßt wurden. In Abbildung 4.26 ist das Ergebnis der Anpassung als durchgezogene Linie gezeigt.



**Abb. 4.26:** Calcium-abhängige Adsorption von Annexin A2m an eine OT-POPC/POPS (4:1)-Doppelschicht. Der Belegungsgrad ( $\Theta$ ) ist gegen die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufgetragen, wobei sich die maximale Belegung von  $\Theta = 1$  auf die Belegung der Oberfläche mit Annexin A2m am Ende eines Titrationsexperimentes bezieht.

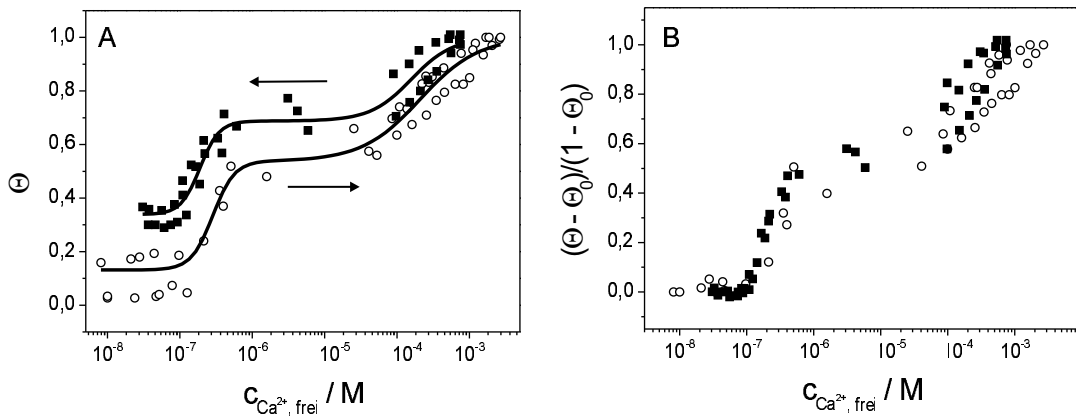
Aus der Kurvenanpassung ergaben sich die in der folgenden Tabelle zusammengefassten Parameter für die beiden Adsorptionsprozesse des Annexin A2m an die OT-POPC/POPS-Schicht.

**Tab. 4.2:** Anfänglicher und intermediärer Belegungsgrad, Dissoziationskonstanten und Hill-Koeffizienten der Annexin A2m-Adsorption an OT-POPC/POPS (4:1)-Membranen.

$\Theta_0$	$K_{0.5} / \text{nM}$	$n$	$\Theta'$	$K'_{0.5} / \mu\text{M}$	$n'$
$0.13 \pm 0.03$	$285 \pm 57$	$2.9 \pm 1.5$	$0.54 \pm 0.06$	$210 \pm 70$	$1.1 \pm 0.2$

Die Werte für eine halbmaximale Bindung ähneln mit  $K'_{0.5} = (210 \pm 70) \mu\text{M}$  bzw.  $K_{0.5} = (285 \pm 57) \text{nM}$  den aus der EGTA-Titrationskurve bestimmten Dissoziationskonstanten sowohl im ersten als auch im zweiten Prozeß. Für die erste Adsorptionsstufe, die der zweiten Desorption in der EGTA-Titration entspricht, ergibt sich mit einem Hill-Koeffizienten von etwa  $n = 3$  ebenfalls ein kooperativer Prozeß, während der zweite Adsorptionsprozeß analog zur ersten Desorptionsstufe der EGTA-Titrationskurve einen nicht-kooperativen Charakter zeigt. Unter Berücksichtigung der etwa 13 % Belegung der Oberfläche mit Protein, die bereits bei einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unterhalb von  $c = 10^{-8} \text{ M}$  beobachtet werden, lagern sich in der ersten Adsorptionsphase etwa 41 % des insgesamt am Ende einer Titration auf der Oberfläche befindlichen Proteins an die Doppelschicht an. Im zweiten Prozeß binden dann noch weitere 46 % bis die maximale Belegung der Oberfläche erreicht ist.

Um die Titrationskurven besser vergleichen zu können, sind in Abbildung 4.27 A beide Kurven in einem Diagramm dargestellt, wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Darstellung der Fehler verzichtet wurde. Die Desorptionskurve (■) ist im Vergleich zur Adsorption (○) insgesamt leicht zu kleineren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen verschoben, was Unterschiede der beiden Vorgänge aufzeigt. Die Kurvenform der Hin- und Rücktitration verlaufen auffallend parallel, was in einer normierten Auftragung noch deutlicher herausgestellt werden kann (Abb. 4.27

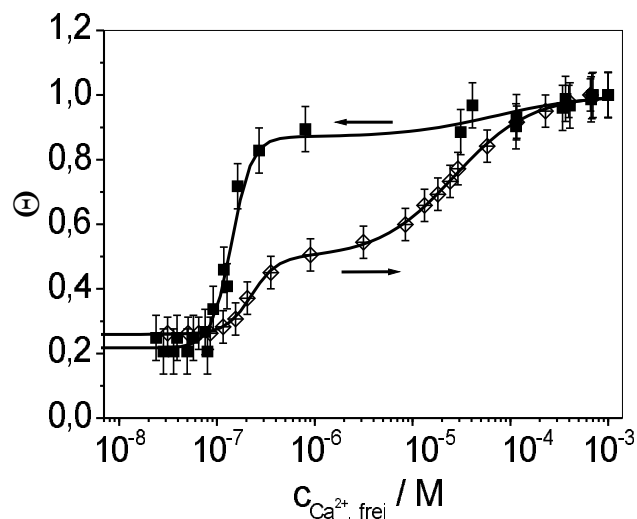


**Abb. 4.27:** A: Vergleich der  $\text{Ca}^{2+}$ - ( $\circ$ ) und EGTA-Titrationskurven ( $\blacksquare$ ) des Annexin A2m. B: Normierte Darstellung der Titrationskurven, in der der Belegungsgrad auf  $\Theta_0$  bezogen ist.

(B)). In dieser Darstellung wurde der Belegungsgrad  $\Theta$  auf den  $\Theta_0$ -Wert bezogen, so daß die Belegung der Oberfläche am Anfang einer EGTA-Titration bzw. am Ende einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Titration auf Null normiert wird. Aus dieser Auftragung wird deutlich, daß die Kurvenverläufe und die Verhältnisse, der desorbierten bzw. adsorbierten Annexin A2m Menge, für beide Vorgehensweisen nahezu identisch sind.

Da wie zu Beginn erwähnt die Titrationsergebnisse des monomeren Annexin A2m mit dem reversiblen Bindungsverhalten des Annexin A2t verglichen werden sollen, sind in der Abbildung 4.28 die Titrationskurven der EGTA- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Titration des Annexin A2t gezeigt. Die Daten der reversiblen Annexin A2t-Membranbindung wurden aus der Dissertation von M. Ross übernommen<sup>[78]</sup>.

Ein Vergleich der intermediären relativen Belegungsgrade ( $\Theta'$ ) zeigt, daß für das Annexin A2m die  $\text{Ca}^{2+}$ - und EGTA-Titrationskurven zwar eine Hysterese aufweisen, die allerdings im Vergleich zur Hysterese der Titrationskurven des Annexin A2t klein ist. Auffällig ist, daß für die zweite Dissoziationsstufe bzw. den ersten Bindungsprozeß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration für halbmaximale Bindung ( $K_{0.5}$ ) für das Annexin A2t zwar tendenziell kleiner ist, jedoch im gleichen Größenbereich wie die  $K_{0.5}$ -Werte der Annexin A2m-Titrationskurven liegen. Für die erste Dissoziationsstufe, bzw. den zweiten Bindungsprozeß liegen die  $K_{0.5}'$ -Werte für den



**Abb. 4.28:**  $\text{Ca}^{2+}$ - und EGTA-Titration des Annexin A2t<sup>1</sup>.

heterotetrameren Annexin A2t Komplex deutlich niedriger als die entsprechenden Werte für das monomere Annexin A2m.

Mit Hilfe des zu Beginn beschriebenen Modells der reversiblen Annexin A2t-Membranbindung wurde die Hysterese der  $\text{Ca}^{2+}$ - und EGTA-Titration durch eine laterale Organisation des Annexins auf der Membranoberfläche erklärt. Da für das Annexin A2m nur eine geringe Hysterese der Titrationskurven beobachtet wurde, würde man eine geringere Tendenz zur lateralen Aggregation des Monomers erwarten. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte mit bildgebenden Methoden die Verteilung sowohl des Annexin A2t als auch des Annexin A2m visualisiert werden.

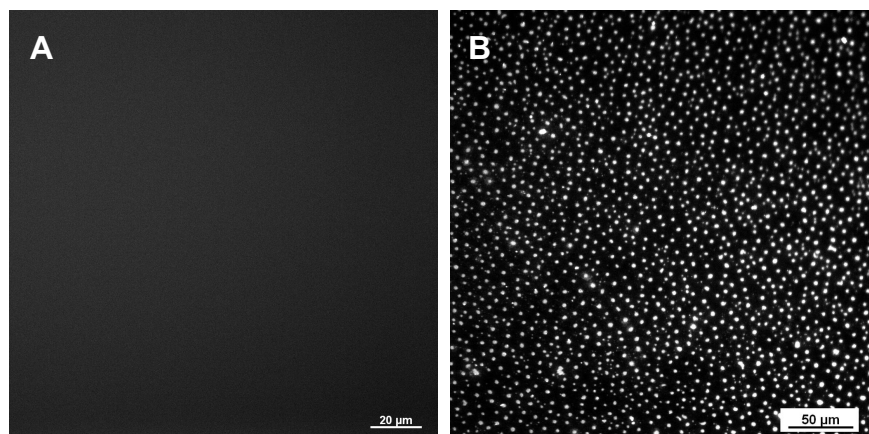
### 4.3.2 Visualisierung der Annexin-Bindung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie bietet die Möglichkeit, die laterale Organisation des Annexin A2 auf einer Membranoberfläche zu visualisieren. So läßt sich feststellen, ob das Annexin A2t homogen über die Lipidschicht verteilt ist oder in definierten Domänen gebunden ist.

<sup>1</sup>aus M. Ross, Quantifizierung der Interaktion von Annexin A2t mit festkörperunterstützten Lipidmembranen, 2003<sup>[78]</sup>

### Charakterisierung des fluoreszenzmarkierten Annexin A2t

Damit das Annexin unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden konnte, wurde ein Fluorophor kovalent an das Protein gebunden (Abschnitt 3.1.5). Da eine solche Modifikation möglicherweise die Struktur und damit die Funktionalität eines Proteins stören kann, wird zunächst die spezifische Bindung des Annexin A2 an negativ geladene Phospholipide beschrieben, um eine unspezifische Protein-Lipid-Wechselwirkung auszuschließen. Ein ideales System für diese Experimente sind die zuvor beschriebenen DPPC/DPPS (4:1)-Lipidschichten, da die negativ geladenen Lipide in dieser Mischung Domänen mit einem Durchmesser von einigen Mikrometern bilden. Die spezifische Assoziation des Annexins mit diesen vorgeformten Bindungsplätzen wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits dokumentiert. Abbildung 4.29 zeigt eine mittels LB-Technik hergestellte DPPC/DPPS (4:1)-Oberfläche vor und nach einer 15 minütigen Inkubation mit 0.4  $\mu\text{M}$  fluoreszenzmarkiertem Annexin A2t.

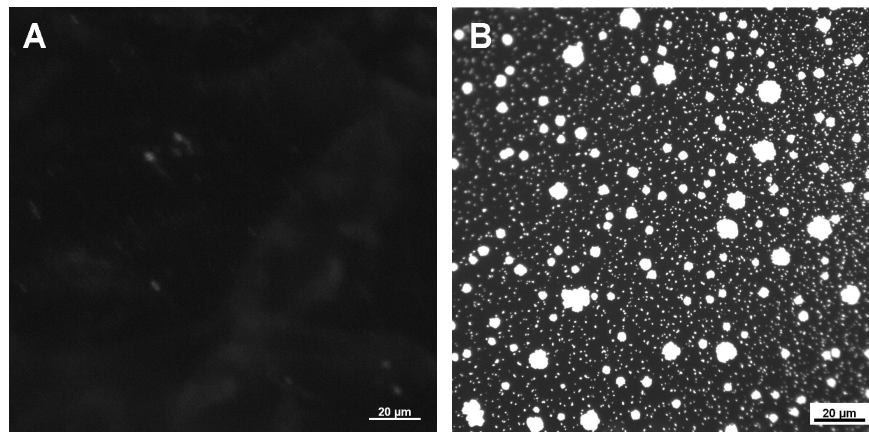


**Abb. 4.29:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer DPPC/DPPS (4:1)-Oberfläche vor (A) und nach (B) der Inkubation mit Annexin A2t. Die Inkubation der Probe erfolgte für 15 min mit einer Proteinkonzentration von 0.4  $\mu\text{M}$  in 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ).

Vor der Inkubation mit Protein erscheint die Oberfläche einer Lipidmembran auf Glimmer schwarz. Nach der Zugabe von Annexin A2t sind helle, regelmäßig verteilte Punkte sichtbar, die einen Durchmesser von  $(3 \pm 1) \mu\text{m}$  aufweisen. Der Bereich zwischen diesen Domänen zeigt keinerlei Fluoreszenz. Ein Vergleich mit rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen erlaubt die Zuordnung der beobachteten Domänen zu DPPS-reichen Domänen, an die das fluoreszenzmarkierte Annexin A2t gebunden hat. Die hellen Domänen belegen 14 % der Gesamtfläche, was in etwa dem Anteil von 20 % negativ-geladenem DPPS entspricht. Die Differenz könnte auf die schlechte Löslichkeit des DPPS zurückzuführen sein, wodurch es zur Ausbildung kleiner Aggregate kommt, wie sie auch mit dem Rasterkraftmikroskop beobachtet werden konnten (siehe Abschnitt 4.10). Dieses Experiment zeigt zum einen, daß das fluoreszenzmarkierte Annexin A2t einen deutlichen Kontrast zur Lipidoberfläche bildet und so gut mit dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden kann. Zum anderen kann ausgeschlossen werden, daß die spezifische Bindung des Annexins an negativ geladene Phospholipide durch den Fluoreszenzfarbstoff beeinträchtigt ist.

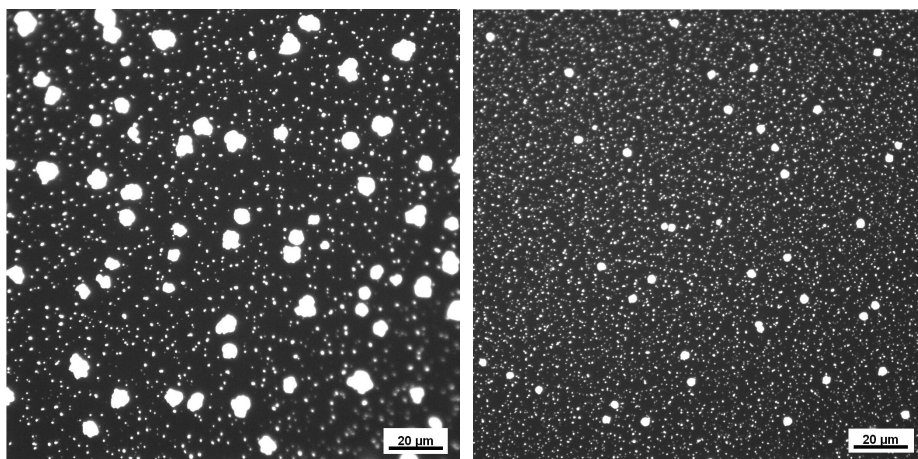
### **Laterale Organisation des Annexin A2t auf fluiden Lipidmembranen**

Die Verwendung von Lipiden, die bei Raumtemperatur in der fluiden Phase vorliegen, ermöglicht die Untersuchung der lateralen Organisation des Annexin A2 auf Membranoberflächen. Die Lipidschichten für die folgenden Untersuchungen wurden durch Spreiten von unilamellaren POPC/POPS (4:1)-Vesikeln auf einer Glimmeroberfläche hergestellt (siehe Abschnitt 3.3.2). Das Verhältnis von 20 % negativ geladenem Phospholipid wurde in Anlehnung an den prozentualen Gehalt in der Plasmamembran gewählt. Die zuvor im Fluoreszenzmikroskop dunkel erscheinende Lipidmembran (Abb. 4.30 (A)) wurde für 15 min mit  $0.4 \mu\text{M}$  Annexin A2t in Anwesenheit von  $1 \text{ mM CaCl}_2$  inkubiert ( $20 \text{ mM Tris/HCl}$ , pH 7.4,  $100 \text{ mM NaCl}$ ,  $1 \text{ mM NaN}_3$ ). Durch mehrmaligen Pufferaustausch der überstehenden Lösung wurde das nicht gebundene Protein aus der Probe entfernt. Eine typische Oberfläche nach der Proteinbindung ist in Abbildung 4.30 gezeigt.



**Abb. 4.30:** A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer POPC/POPS (4:1)-Oberfläche. B: Nach einer 15 minütigen Inkubation der Probe mit Annexin A2t ( $c = 0.4 \mu\text{M}$ ) in 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ) sind helle Domänen unterschiedlicher Größe zu beobachten.

Das Annexin A2t bedeckt nicht in einer gleichmäßigen Schicht die Oberfläche, sondern ist in hellen Domänen unterschiedlicher Größe organisiert. Die Oberflächenbelegung wurde mittels einer auf Helligkeitsunterschieden basierenden Pixelanalyse zu  $(11 \pm 4) \%$  bestimmt. In einem Kontrollexperiment wurde Annexin A2t in Anwesenheit von 1 mM EGTA zu einer POPC/POPS-Membran gegeben, worauf keine spezifische Proteinbindung an der Oberfläche detektiert werden konnte. Auch auf einer Glimmeroberfläche, auf der zuvor keine Lipidmembran immobilisiert wurde, war keine Proteinbindung zu beobachten. Um zu dokumentieren, daß die Domänenverteilung auf der Oberfläche nicht überall gleich war, sind in Abbildung 4.31 repräsentativ zwei unterschiedliche Stellen derselben Probe dargestellt. Diese ungleiche Verteilung wird durch die statistische Auswertung der Größenverteilung berücksichtigt (siehe unten).



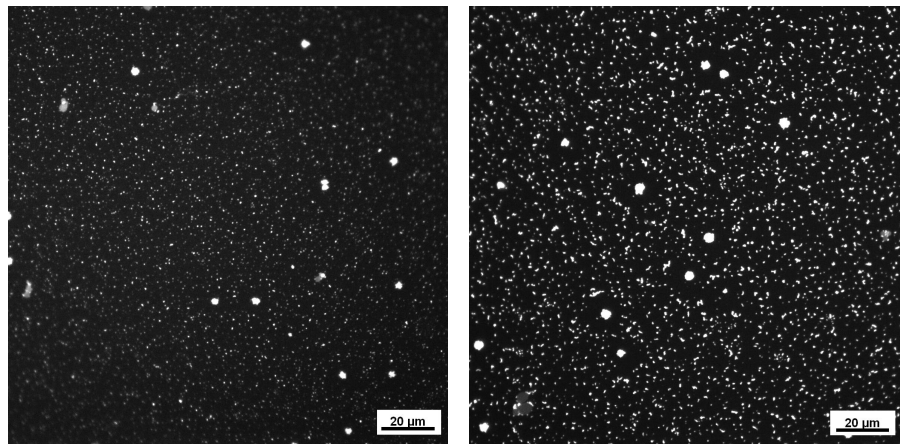
**Abb. 4.31:** Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen einer POPC/POPS (4:1)-Oberfläche nach Zugabe von Annexin A2t.

### Laterale Organisation des Annexin A2m auf fluiden Lipidmembranen

Die zuvor beschriebenen Quarzmikrowaage-Messungen deuten darauf hin, daß sich monomeres und tetrameres Annexin A2 in ihrer Fähigkeit unterscheiden, laterale Aggregate zu bilden. Nachdem für das Annexin A2t tatsächlich die Ausbildung von Domänen unterschiedlicher Größe gezeigt werden konnte, wurden in analoger Weise zu den beschriebenen Annexin A2t Fluoreszenzaufnahmen Experimente mit fluoreszenzmarkiertem Annexin A2m durchgeführt. In Abbildung 4.32 sind zwei repräsentative Fluoreszenzaufnahmen einer POPC/POPS (4:1)-Membranoberfläche nach 15 minütiger Inkubation mit  $0.4\text{ }\mu\text{M}$  Annexin A2m gezeigt. Nicht-gebundenes Protein wurde durch mehrfachen Austausch der überstehenden Lösung entfernt, so daß die Hintergrundfluoreszenz minimiert werden konnte.

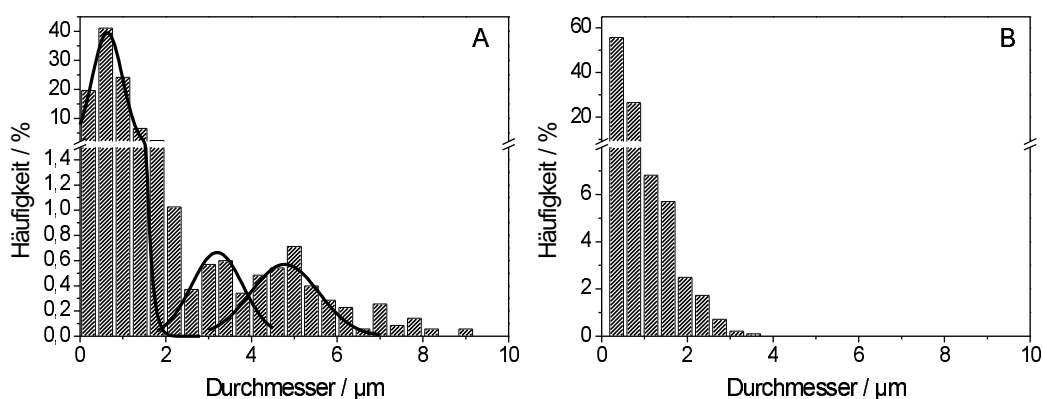
Ähnlich wie zuvor für den heterotetrameren Komplex beschrieben, ist das Protein nicht homogen in einer Schicht über die Lipidoberfläche verteilt, sondern in kleinen Domänen organisiert, die  $(8 \pm 2)\%$  der Oberfläche bedecken. Die Größenverteilung der beobachteten Domänen ist in Abbildung 4.33 für das Annexin A2t (A) und Annexin A2m (B) wiedergegeben. Das *Binning* wurde auf 400 nm gesetzt, da dies der Auflösungsgrenze des experimentellen Aufbaus entsprach.





**Abb. 4.32:** Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen einer POPC/POPS (4:1)-Oberfläche nach 15 minütiger Inkubation mit Annexin A2m in Anwesenheit von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ).

Tendenziell sind für das Annexin A2t drei Größenpopulationen aus der Verteilung zu erkennen. 94 % der detektierten Domänen besitzen einen Durchmesser, der kleiner ist als 2 µm. Obwohl die Anzahl der kleinen Domänen damit sehr viel größer ist als die Anzahl der großen Domänen, tragen kleinere Domänen nicht so viel zur Gesamtfläche des auf der Probenoberfläche gebundenen Proteins bei. Etwa 64 % der Fläche, bezogen auf die Gesamtfläche des gebundenen Proteins, liegt in Domänen mit einem Durchmesser von mehr als 2 µm vor. Betrachtet man die Größenverteilung der Domänen des Annexin A2m im Vergleich zum Annexin A2t so wird deutlich, daß im Fall des monomeren Annexins keine Aggregate im Größenbereich von 4-8 µm zu beobachten sind. Die Tendenz zur lateralen Organisation scheint also für den Annexin A2t Komplex ausgeprägter zu sein.



**Abb. 4.33:** Vergleich der Domänengrößenverteilung des Annexin A2t (A) und A2m (B).

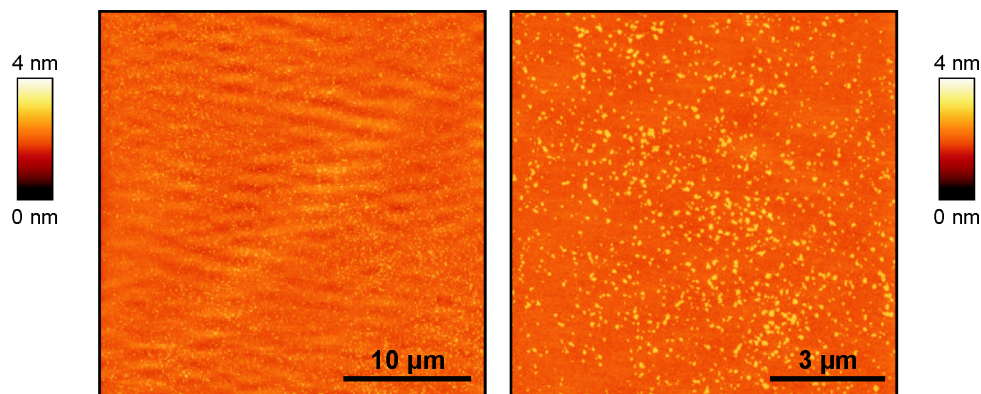
### 4.3.3 Visualisierung der Annexin - Bindung mittels Rasterkraftmikroskopie

Mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie kann die Proteinbindung auch ohne eine Modifizierung der Moleküle untersucht werden, wodurch eine Beeinflussung des Bindungsverhaltens aufgrund des Fluorophors ausgeschlossen werden kann. Eine höhere Auflösung liefert zudem ein detaillierteres Bild der Probenoberflächen, wobei auch Strukturen in der Lipidschicht selber sichtbar gemacht werden können. Im folgenden sollen zunächst die verwendeten Lipidschichten charakterisiert werden, bevor die Annexin A2 Bindung an POPC/POPS-Membranen beschrieben wird.

#### Charakterisierung der POPC/POPS-Schichten mittels Rasterkraftmikroskopie

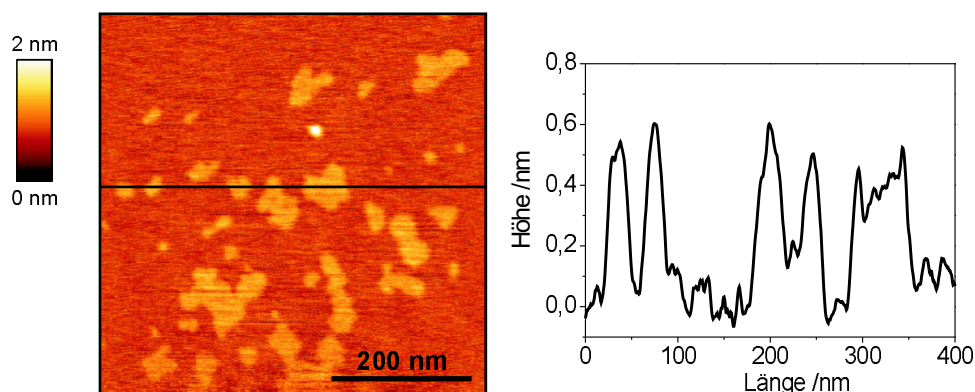
Die verwendeten POPC/POPS (4:1)-Schichten wurden mit Hilfe der Vesikelspreitmethode auf frisch gespaltenem Glimmer präpariert (vergl. Abschnitt 3.3.2). Um eine defektfreie Membran zu erhalten, war die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ( $c = 25 \text{ mM}$ ) notwendig, während in EGTA-haltiger Lösung keine erfolgreiche Präparation einer Membran nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis einer Membranbildung kann über sichtbare Strukturen, wie z.B. Defekte oder phasenseparierte Bereiche unterschiedlicher Höhe oder Reibung, erfolgen. Zeigt eine Membranoberfläche keine strukturellen Höhenunterschiede, so kann sie in topographischen Aufnahmen nicht von einer glatten Substratoberfläche unterschieden werden. Der Nachweis der Membranbildung kann in diesem Fall durch einen für eine Lipiddoppelschicht charakteristischen Verlauf der Kraft - Abstands - Kurve erfolgen.

In Abbildung 4.34 sind topographische Aufnahmen einer POPC/POPS-Oberfläche in Anwesenheit von  $1 \text{ mM CaCl}_2$  gezeigt, in denen helle, separierte Strukturen erkennbar sind. Die in ihrer Form sehr variablen Domänen haben einen Durchmesser von  $20 - 100 \text{ nm}$  und belegen je nach Präparation etwa  $15 - 20 \%$  der Oberfläche.



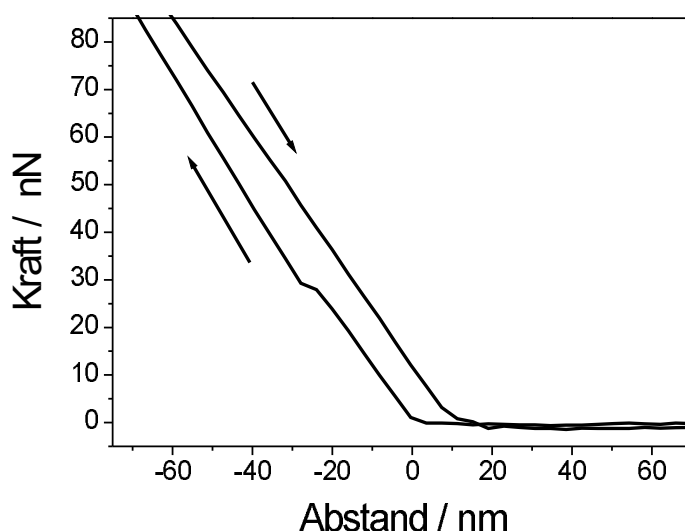
**Abb. 4.34:** Topographische Übersichtsaufnahmen einer POPC/POPS (4:1) - Membran in 1 mM  $\text{CaCl}_2$  - Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ).

Die statistisch über die Probe verteilten Domänen bestehen vermutlich überwiegend aus POPS, wobei die negativ geladenen Kopfgruppen über  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen verbrückt werden. Nach einem Austausch der überstehenden Lösung mit frischem Puffer, der  $\text{Ca}^{2+}$ -komplexierendes EGTA enthielt, konnte keine Phasenseparation mehr beobachtet werden. Die Höhe der Domänen beträgt bei Messungen im *intermittent-contact* Modus ca. 0.5 nm (Abb. 4.35). Werden die Messungen im *contact* Modus durchgeführt ist die Höhe stark von der zwischen Probe und Spitze herrschenden Kraft abhängig und kann bis zu 1.5 nm betragen.



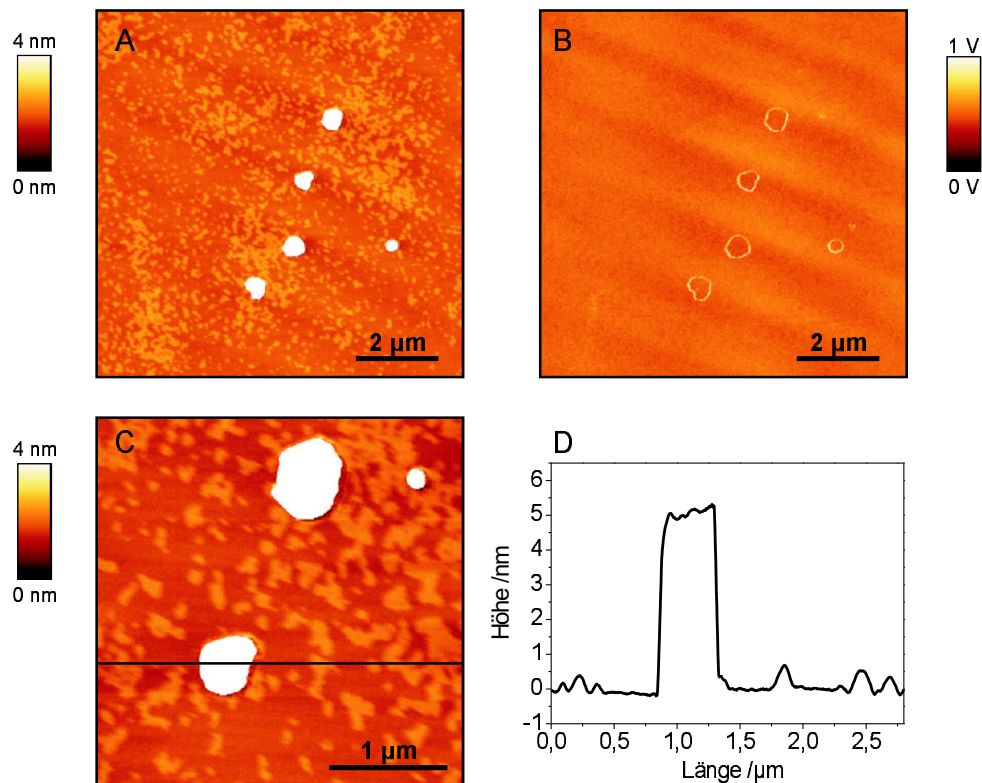
**Abb. 4.35:** Vergrößerung der POPS-reichen Lipiddomänen mit zugehörigem Höhenprofil. Der Höhenunterschied zwischen den beiden Phasen beträgt im *intermittent-contact* Modus etwa 0.5 nm.

Die Phasenseparation zwischen POPC und POPS konnte nicht reproduzierbar bei allen Präparationen beobachtet werden. Ob die POPS-reichen Domänen in den Fällen tatsächlich nicht vorhanden waren oder ob sie nicht abgebildet werden konnten, blieb unklar. Untersuchungen deuten darauf hin, daß sich die Domänen in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zunächst an Defektstellen in einer Art Kristallisationsprozeß ausbilden. Die Defekte könnten dann durch fluides POPC ausheilen und wären nicht mehr sichtbar (Janshoff et al., unveröffentlichte Daten). Die im Folgenden beschriebene Proteinadsorption auf der Lipidoberfläche war jedoch unabhängig davon, ob zuvor PS-reiche Domänen sichtbar waren oder nicht. Da die resultierende Oberfläche im Fall der nicht zu beobachtenden Phasenseparation völlig glatt war, wurde eine erfolgreiche Membranbildung mit Hilfe einer Kraft-Abstands-Kurve überprüft (vergl. Abschnitt 3.2.4). Ist eine Lipiddoppelschicht vorhanden, so zeichnet sich die Kurve im linearen Bereich durch einen sogenannten Durchbruch aus. Die lineare 1:1-Bewegung von *cantilever*-Verbiegung und Piezoausdehnung wird hier kurzzeitig unterbrochen, da der *cantilever* die erste Schicht der Membran durchdringt, was sich in einem waagerechten Plateau innerhalb des linearen Anstiegs äußert (Abb. 4.36).



**Abb. 4.36:** Kraftabstandskurve mit einem für eine Lipidschicht charakteristischen Durchbruch.

Vereinzelte wurden bei der Präparation von POPC/POPS-Lipidschichten runde, ca. 4.5 nm hohe Bereiche beobachtet (Abb. 4.37). Da in der Phaseninformation kein Kontrast sichtbar ist und der Höhenunterschied zur Membranoberfläche mit 4.5 nm der Höhe einer Lipiddoppelschicht entspricht, handelt es sich bei diesen Bereichen sehr wahrscheinlich um eine zweite Lipiddoppelschicht.

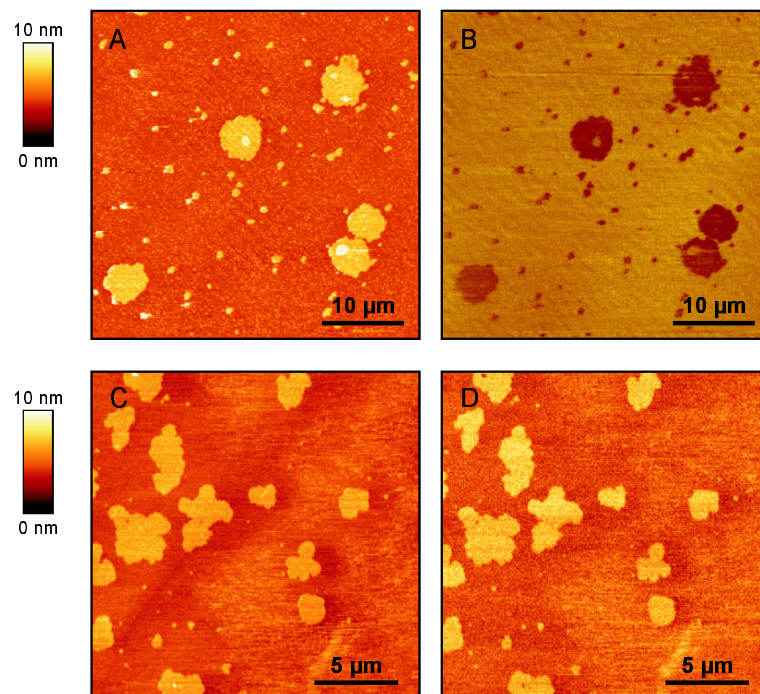


**Abb. 4.37:** Topographie (A) und Phasensignal (B) einer POPC/POPS-Lipiddoppelschicht auf der sich einzelne Membranfragmente befinden. Das Höhenprofil (D) der Vergrößerung solcher Membranfragmente (C) zeigt einen Höhenunterschied von ca. 4.5 nm.

#### Bindung des Annexin A2t auf POPC/POPS-Membranen

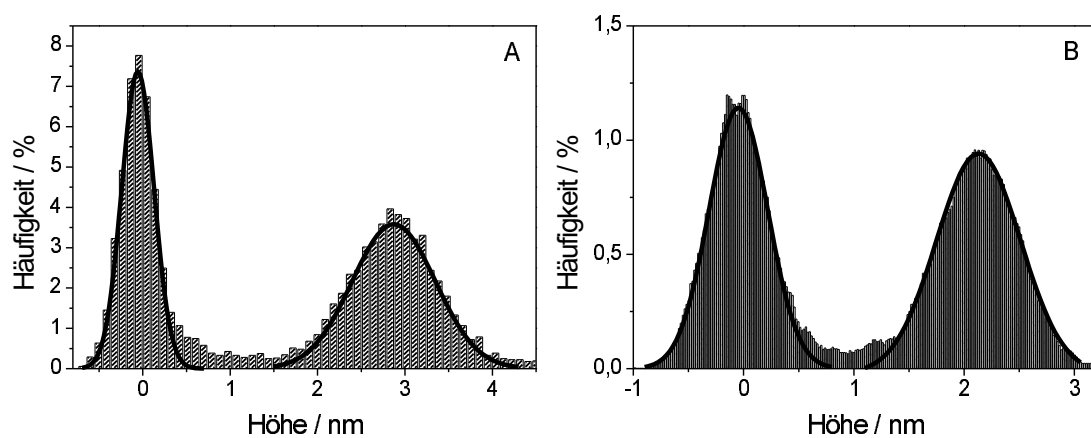
In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen war bereits die Organisation des Annexin in lateralen Aggregaten beobachtet worden. Mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie sollten diese Ergebnisse unabhängig von einer kovalenten Modifika-

tion des Proteins durch Farbstoffmoleküle bestätigt werden. In Abbildung 4.38 ist eine POPC/POPS (4:1)-Lipidschicht nach der Inkubation mit  $0.4\text{ }\mu\text{M}$  Annexin A2t gezeigt. In der Höheninformation (A,C) sind Domänen unterschiedlicher Form zu beobachten, die  $(6 \pm 3)\%$  der Oberfläche belegen. Der große Fehler ist auf die unregelmäßige Verteilung des Proteins innerhalb des begrenzten Scanbereichs des Rasterkraftmikroskops zurückzuführen. Die Bestimmung der prozentualen Oberflächenbelegung anhand der Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen, die einen größeren Ausschnitt der Probenoberfläche zeigen, scheint für dieses System geeigneter. In der lateralen Reibungsmikroskopie (Abb. 4.38 (B)) zeigen die Annexin-Domänen einen deutlichen Kontrast zur Membrenumgebung, wodurch eine Unterscheidung von gebundenem Protein und Lipidoberfläche ermöglicht wird. Im Phasensignal des *intermittent contact*-Modus ist ebenfalls ein klarer Kontrast erkennbar, der Materialunterschiede zwischen der gebundenen Annexin A2t-Schicht und der Lipidmembran verdeutlicht (D).



**Abb. 4.38:** Topographische Aufnahmen einer POPC/POPS (4:1) Schicht nach der Bindung von Annexin A2t an die Oberfläche (A: *contact*-Modus, C: *intermittent contact*-Modus) Sowohl aus der lateralen Reibung (B) als auch aus dem Phasensignal (D) sind Materialunterschiede zwischen Protein und umgebender Lipidschicht zu erkennen.

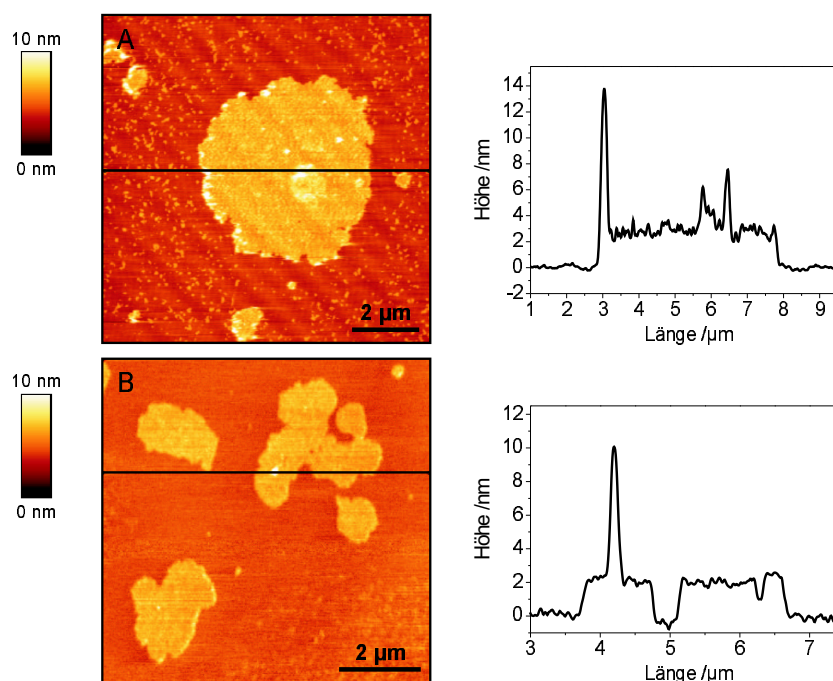
Histogrammanalysen mehrerer Proteindomänen ( $n = 17$ ) im *contact*-Modus ergaben einen Höhenunterschied zwischen der Membranoberfläche und dem Annexin A2t von  $(2.6 \pm 0.4)$  nm (Abb. 4.39 (A)). Für Messungen im *intermittent contact*-Modus ergaben die Höhenanalysen der Proteindomänen ( $n = 23$ ) einen Wert von  $(2.0 \pm 0.2)$  nm (Abb. 4.39 (B)). Dies deutet darauf hin, daß bei einem direkten Kontakt zwischen Probenoberfläche und Spitze die Lipidschicht im Vergleich zu Protein-bedeckten Bereichen stärker deformiert wird. Eine Vergröße-



**Abb. 4.39:** Histogramme zur Höhenanalyse von Annexin A2t-Domänen. (A) *contact*- und (B) *intermittent contact*-Modus.

rung der Proteindomänen läßt erkennen, daß auf der Annexinschicht noch zusätzlich höhere Strukturen zu beobachten sind. Abbildung 4.40 zeigt Vergrößerungen der Annexin-Domänen im *contact*- (A) bzw. im *intermittent contact*-Modus (B) mit den zugehörigen Höhenprofilen. Die Schicht in der Mitte der Proteindomäne im *contact*-Bild ist etwa 3-4 nm höher als die Proteinschicht. Wahrscheinlich hat sich hier eine zweite Proteinschicht auf der ersten Annexin-Lage gebildet. Die höheren Objekte sind vermutlich Aggregate des Annexin A2t, die in der Anzahl der Moleküle variieren. So könnten die Aggregate auf der Proteindomäne im *intermittent contact*-Bild, die einen Höhenunterschied von ca. 8 nm zur Proteinschicht haben, aus zwei aufeinander gestapelten Annexin-Molekülschichten von je 4 nm gebildet werden.





**Abb. 4.40:** Höhenprofil einer Annexin A2t-Domäne auf einer POPC/POPS (4:1)-Doppelschicht.

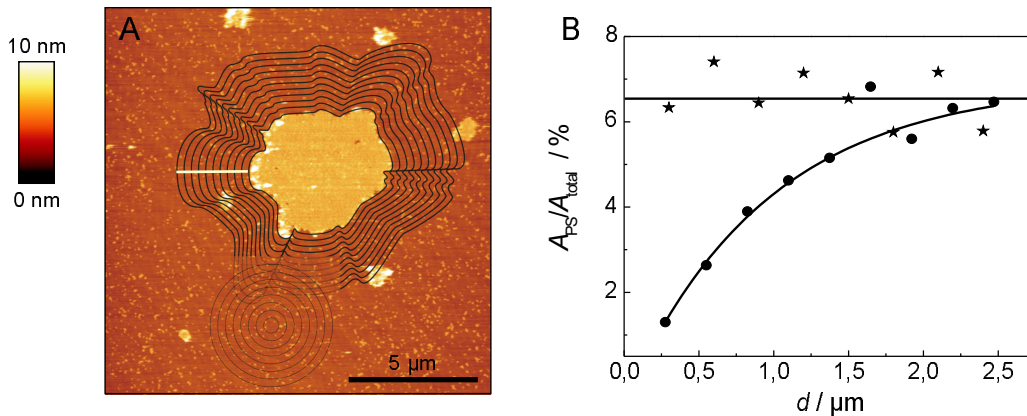
### PS - Rekrutierung durch Annexin A2t

In dem von Ross et al. aufgestellten Modell der Annexin A2t-Bindung an OT-POPC/POPS-Membranen wird eine Rekrutierung der negativ-geladenen PS-Lipide diskutiert, die durch Wechselwirkungen zwischen Annexin A2t und den Lipiden induziert wird<sup>[35]</sup>. Auch andere Studien deuten auf eine Annexin-induzierte laterale Aggregation negativ-geladener Lipide in Lipiddoppelschichten hin<sup>[126,127]</sup>. Es stellte sich die Frage, ob eine Umorganisation der negativ-geladenen Phospholipide als Folge der Annexin A2t-Bindung mit dem Rasterkraftmikroskop visualisiert werden könnte.

Eine genauere Betrachtung der Proteindomänen auf der Probenoberfläche zeigt, daß die Lipidschicht in der direkten Umgebung an PS-reichen Aggregaten verarmt ist. Zur quantitativen Beschreibung dieses Phänomens wurden um eine Proteindomäne Ringe mit konstant wachsendem Durchmesser gelegt, wodurch die umgebende Fläche in Ringflächen mit wachsendem Abstand zur Proteindomäne unterteilt wurde. Ein Beispiel für diese graphische Auswertung ist



in Abbildung 4.41 (A) dargestellt. Mittels einer auf Farbunterschieden basierenden Pixelanalyse wurde dann die Fläche an PS-reichen Domänen innerhalb einer Ringfläche bestimmt. Trägt man die prozentuale PS-Fläche bezogen auf die jeweilige Ringfläche ( $\bullet$ ) gegen den Abstand des Ringrandes von der Proteindomäne auf, so erhält man das in Abbildung 4.41 (B) dargestellte Diagramm. Die Abstandsbestimmung erfolgte dabei entlang der eingezeichneten, hellen Linie. Mit zunehmendem Abstand von der Proteindomäne ist ein Anstieg der PS-Fläche pro Ringfläche zu beobachten, dessen Verlauf zunächst linear beginnt und in einen Sättigungswert mündet. Die durchgezogene Linie dient zur Verdeutlichung des Kurvenverlaufs. Der Sättigungsendwert variierte innerhalb der betrachteten Proteindomänen zwischen 6-12 %, jedoch war der allgemeine Kurvenverlauf übereinstimmend zu beobachten.



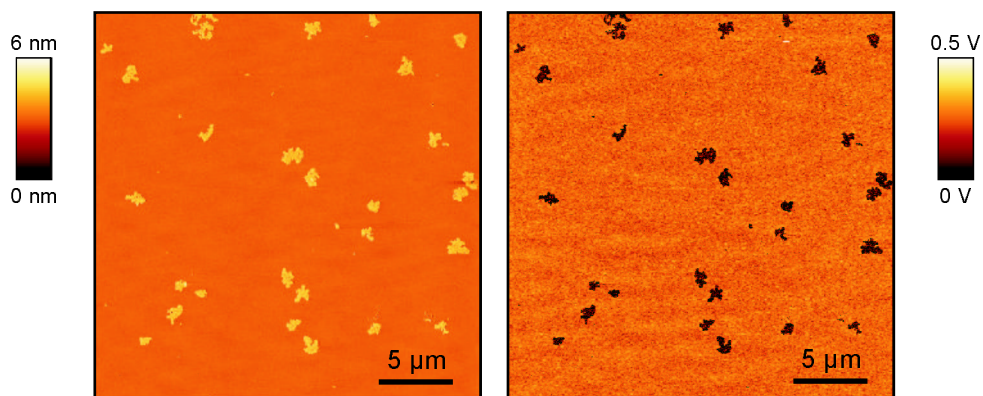
**Abb. 4.41:** Verteilung negativ-geladener POPS-Domänen in der Umgebung einer Annexin A2t-Domäne. (A) Topographiebild einer Annexin A2t Domäne mit äquidistanten Ringen wachsenden Durchmessers zur graphischen Auswertung des PS-Gehalts in Abhängigkeit des Abstandes  $d$  zur Proteindomäne. (B) Verteilung der negativ-geladenen POPS-Aggregate um die Proteindomäne ( $\bullet$ ) und um einen willkürlich gewählten Punkt in der Umgebung ( $\star$ ). Die prozentuale PS-Fläche pro Ringfläche ist gegen den Abstand des jeweiligen Ringes zum innersten Ring aufgetragen.

Zum Vergleich wurden Bereiche in der Umgebung der Proteindomäne ebenfalls gleichmäßig in Ringflächen unterteilt und die Verteilung der PS-reichen Domä-

nen betrachtet. Ein Beispiel für einen solchen Bereich ist in Abbildung 4.41 (A) gekennzeichnet und die Verteilung der negativ-geladenen PS-Lipide in Abhängigkeit vom Abstand ( $\star$ ) dargestellt (B). Der Abstand  $d$  definiert sich dabei als Differenz  $d = r - r_0$  aus dem Radius des innersten Ringes  $r_0$  um einen beliebig gewählten Mittelpunkt und dem Radius des jeweiligen Ringes  $r$ . Analog zur zuvor beschriebenen Auswertung für die Fläche um eine Proteindomäne, ist die Fläche an PS-reichen Aggregaten prozentual auf die jeweilige Ringfläche bezogen. Es zeigt sich, daß keine Abhängigkeit der PS-Domänenverteilung vom Abstand eines willkürlich gewählten Punktes zu beobachten ist. Der waagerechte Verlauf bei etwa 6 % PS-reicher Fläche entspricht dem Sättigungswert des Anstiegs in der Proteinumgebung.

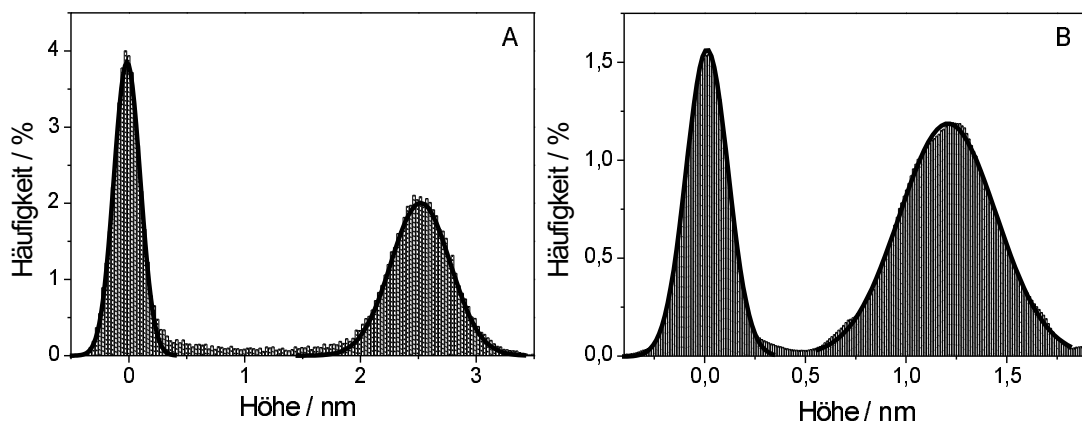
### **Bindung des Annexin A2m auf POPC/POPS - Schichten**

Aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen geht ein deutlicher Unterschied in der Größenverteilung von Annexin A2t- und A2m-Domänen hervor. Um dieses Ergebnis zu bestätigen und einen Vergleich zu den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen des Annexin A2t ziehen zu können, wurde auch die laterale Organisation des monomeren Annexins auf Lipidmembranoberflächen mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie visualisiert. In Abbildung 4.42 ist die Oberfläche einer POPC/POPS (4:1)-Membran nach 30 minütiger Inkubation mit Annexin A2m ( $c \geq 0.3 \mu\text{M}$ ) dargestellt. Die topographische Übersichtsaufnahme zeigt Annexin-Domänen unterschiedlicher Form, die im zugehörigen Phasensignal einen deutlichen Kontrast zur umgebenden Lipidschicht zeigen. Durch den angezeigten Materialunterschied lassen sich die Proteindomänen gut von der Membranoberfläche unterscheiden. Die Belegung mit Annexin beträgt  $(3 \pm 1) \%$  der Gesamtoberfläche.



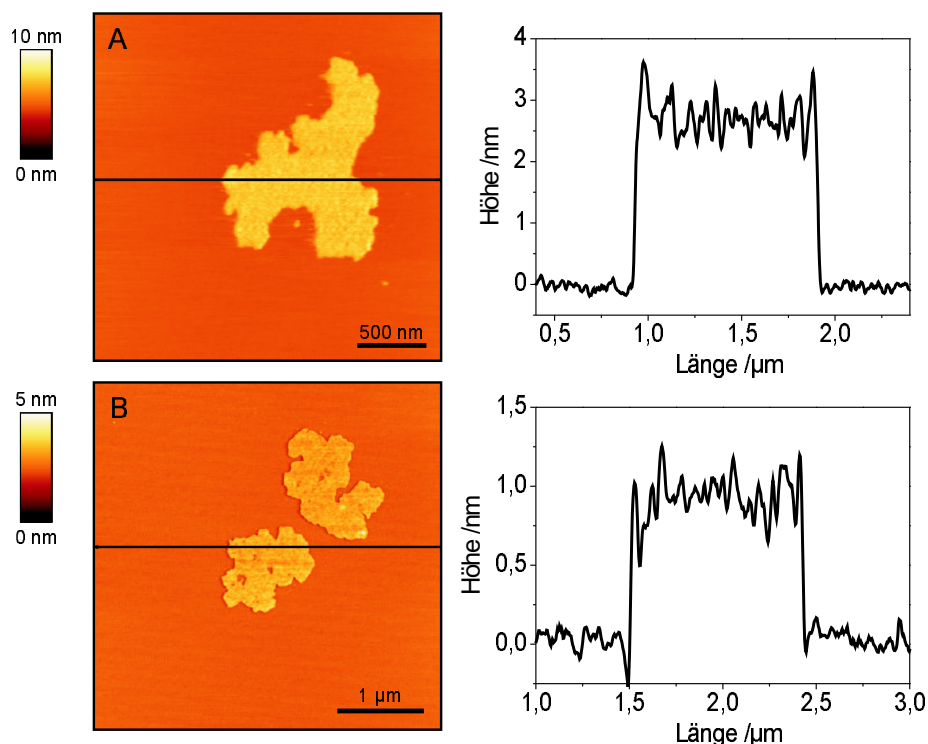
**Abb. 4.42:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahme mit zugehörigem Phasensignal von Annexin A2m auf einer POPC/POPS (4:1)-Membran in Anwesenheit von  $\text{CaCl}_2$  (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ).

Abhängig von dem verwendeten Abbildungsmodus variiert der Höhenunterschied der Annexin A2m-Lage zur Lipidoberfläche. Histogrammanalysen ergaben einen Höhenunterschied von  $(2.4 \pm 0.1)$  nm für Messungen im *contact*-Modus ( $n = 9$ ) (Abb. 4.43 (A)), während für Messungen im *intermittent contact*-Modus ein Höhenunterschied von  $(1.3 \pm 0.1)$  nm ermittelt wurde ( $n = 30$ ) (Abb. 4.43 (B)).



**Abb. 4.43:** Histogramme zur Höhenanalyse von Annexin A2m-Domänen. (A) *contact*- und (B) *intermittent contact*-Modus.

In Abbildung 4.44 ist die Vergrößerung einer Annexin-Domäne sowohl für den *contact*-Modus (A) als auch *intermittent contact*-Modus (B) dargestellt. Entlang der durchgezogenen Linie ist jeweils das nebenstehende Höhenprofil aufgenommen worden, aus denen sich ein Höhenunterschied zwischen Annexin und Lipidmembran von ca. 2.5 nm bzw. 1 nm ablesen läßt.

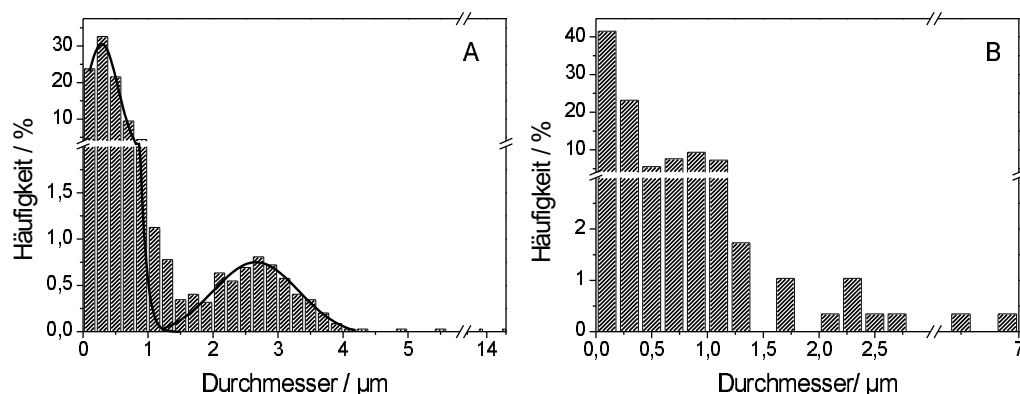


**Abb. 4.44:** Höhenprofile von Annexin A2m-Domänen im *contact*-Modus (A) und im *intermittent contact*-Modus (B).

### Größenverteilung der Annexin-Domänen

Analog zu der Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde die Größenverteilung der in den rasterkraftmikroskopischen Topographieaufnahmen beobachteten Annexin-Domänen analysiert. Hierzu wurde eine auf Helligkeitsunterschieden basierende Pixelanalyse mit dem Programm SPIP der Firma Image Metrology durchgeführt. In Abbildung 4.45 sind die Größenverteilungen der Proteindomänen für Annexin A2t und A2m gegenübergestellt. Für das heterotetra-

mere Annexin ergeben sich zwei Größenpopulationen, die jeweils eine Gaußverteilung aufweisen. Im Diagramm sind zwei Gaußkurven an die Daten angepaßt. Die Verteilung der ersten Population hat ein Maximum bei einem Durchmesser von etwa 300 nm, während das Maximum der Glockenkurvenverteilung der größeren Domänen bei einem Durchmesser von 2,6  $\mu\text{m}$  liegt. Summiert man die Fläche aller Annexin-Domänen und betrachtet dann den Anteil der Fläche, den die größeren Domänen ausmachen, so ergibt sich ein Wert von 71 %. Dies bedeutet, daß obwohl es zahlenmäßig mehr kleine Domänen gibt, ist das meiste Protein in großen Domänen gebunden. Bei monomerem Annexin A2 kann keine eindeutige Unterteilung in zwei Populationen vorgenommen werden. Hier sind lediglich vereinzelt Annexin A2m Domänen mit einem Durchmesser größer als 1,5  $\mu\text{m}$  zu beobachten. Im Wesentlichen entsprechen die Ergebnisse, denen der fluoreszenzmikroskopischen Daten.



**Abb. 4.45:** Domänengrößenverteilung des Annexin A2t (A) und Annexin A2m (B) in Anwesenheit von 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Die durchgezogenen Linien in A sollen die Gaußverteilung der beiden Größenpopulationen verdeutlichen.

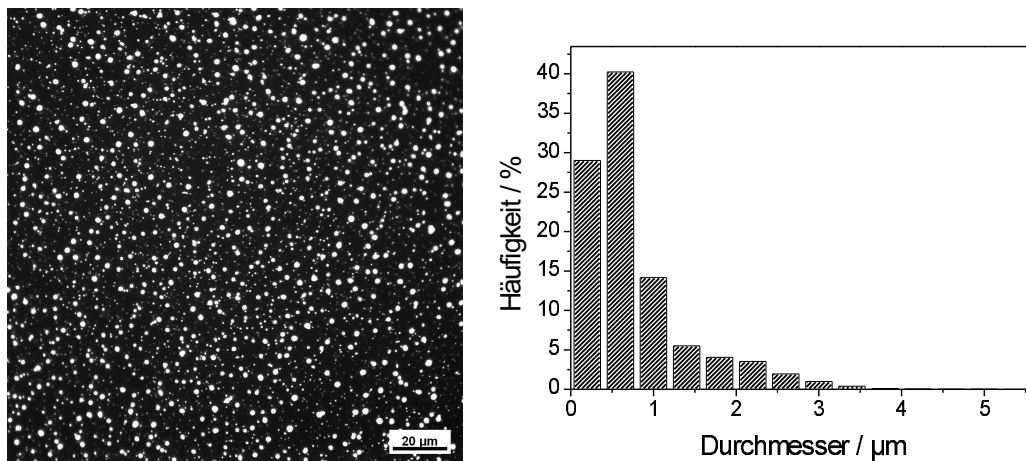
Um einen Eindruck darüber zu gewinnen, inwieweit die Oberflächenbelegung und Größenverteilung von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration abhängt, wurden analoge Messungen in 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer durchgeführt. Die prozentuale Belegung der Probenoberfläche mit Annexin A2t-Domänen ergab sich zu  $(3 \pm 2) \%$ . Die Größenverteilung der Proteindomänen zeigt analog zu den Auswertungen in 1 mM

$\text{Ca}^{2+}$ -Puffer zwei Größenpopulationen im Bereich von 0-2  $\mu\text{m}$  und von 2-4  $\mu\text{m}$  Durchmesser. Allerdings sind nur 56 % der gesamten durch das Annexin A2t belegten Fläche der größeren Domänenpopulation zuzuschreiben. Im Vergleich dazu lag dieser Wert für die Messungen in Anwesenheit von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  bei 71 %, was bedeutet daß die Tendenz zur Bildung großer lateraler Aggregate bei höherem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt größer ist.

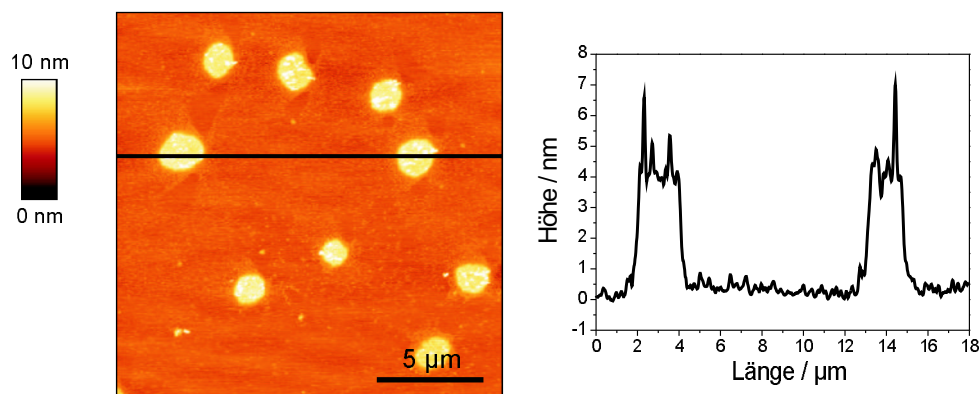
#### 4.3.4 Einfluß von Cholesterin

Für das Annexin A2t wird neben der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Membranbindung auch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Assoziation mit zellulären Membranen beschrieben, die durch Cholesterin-komplexierende Wirkstoffe gestört wird. Für die *in vivo* beobachtete Cholesterin-abhängige Membranbindung gibt es verschiedene Erklärungsansätze, bei denen unter anderem eine durch Cholesterin-induzierte Stabilisierung spezieller Membranstrukturen diskutiert wird. Es stellt sich daher die Frage, wie sich Cholesterin tendenziell auf die laterale Verteilung des Annexin A2t auf der Membranoberfläche auswirkt.

Mit Hilfe der Vesikelspreitmethode wurde wie in Abschnitt 3.3.2 eine POPC/POPS/Cholesterin (5:2:3)-Membran auf einer Glimmroberfläche präpariert. In Abbildung 4.46 ist eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer POPC/POPS/Cholesterin (5:3:2)-Doppelschicht nach 15 minütiger Inkubation mit Annexin A2t ( $c = 0.35 \mu\text{M}$ ) gezeigt (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ). Es sind, wie zuvor für POPC/POPS (4:1)-Schichten beschrieben, runde Annexin A2t-Domänen zu erkennen, die einen deutlichen Kontrast zur Membranoberfläche bilden. In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind  $(12 \pm 2) \%$  der Oberfläche mit Annexin A2t-Domänen belegt. Die Größenverteilung der beobachteten Annexin A2t-Domänen zeigt im Vergleich zur Verteilung auf POPC/POPS-Membranen ohne Cholesterin keine Aggregate im Bereich oberhalb von ca. 3  $\mu\text{m}$  Durchmesser und keine charakteristische Bildung unterschiedlicher Größenpopulationen.



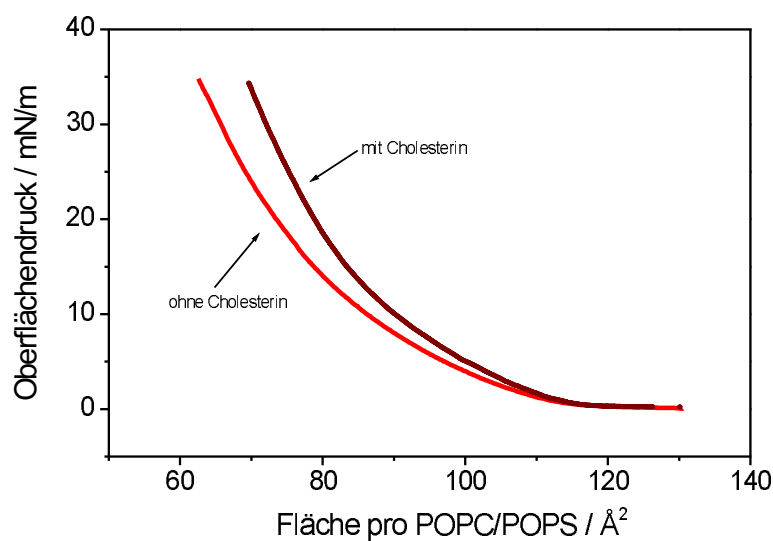
**Abb. 4.46:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer POPC/POPS/Cholesterin (5:2:3)-Oberfläche nach der Inkubation mit Annexin A2t in 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ) und Größenverteilung der beobachteten Annexin A2t-Domänen.



**Abb. 4.47:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahme von Annexin A2t-Domänen auf einer POPC/POPS/Cholesterin (5:2:3)-Oberfläche 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ). Das nebenstehende Höhenprofil wurde entlang der durchgezogenen Linie erhalten.

Das in Abbildung 4.47 gezeigte Höhenprofil zeigt einen Höhenunterschied des Proteins zur Lipidmembran von etwa 4 nm. Histogrammanalysen über  $n = 18$  Proteindomänen ergaben eine Höhendifferenz von  $(4.6 \pm 0.6)$  nm. Der auf Cholesterin-haltigen Membranen gefundene Höhenunterschied entspricht tendenziell der Höhendifferenz von 4.3 nm zwischen Annexin- und Lipidschicht, die für

in der Gel-Phase befindliche DPPC/DPPS-Membranen bestimmt wurde (siehe Abschnitt 4.10). Diese Beobachtungen deuten daraufhin, daß die POPC/POPS-Lipidschicht durch die Anwesenheit von Cholesterin einen dichteren, festeren Charakter aufweist und daher das Annexin nicht so tief in die Lipidmembran eindringen kann. Um zu überprüfen, ob Cholesterin eine dichtere Packung der Lipide ermöglicht, wurden Isothermen POPC/POPS/Cholesterin (5:2:3)-Monoschichten an der Luft/Wasser-Grenzfläche aufgenommen (Abb. 4.48).



**Abb. 4.48:** Druck-Fläche-Isotherme einer POPC/POPS (4:1)- und POPC/POPS/Cholesterin (5:2:3)-Monoschicht auf einer  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Subphase (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ).

Die gezeigten Isothermen wurden auf  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ) durchgeführt. Die Komplexbildung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der Subphase durch EGTA zeigte keinen Einfluß auf den Kurvenverlauf der jeweiligen Isothermen. In Anwesenheit von Cholesterin ist ein steilerer Anstieg der Isotherme zu beobachten, was eine geringere Kompressibilität der Lipidmonoschicht bedeutet. Bei der dargestellten Auftragung ist die Fläche pro Molekül auf die POPC/POPS-Moleküle bezogen, wodurch die Anwesenheit der Cholesterin-Moleküle nicht berücksichtigt wird. Da somit tatsächlich mehr Moleküle auf der Oberfläche sind, als bei der Berechnung der Fläche pro Molekül berücksichtigt werden, sollte bei gleicher Fläche ein höherer Druck zu



beobachten sein, d.h. die Isotherme ist zu größeren Flächen pro Molekül verschoben. Berechnet man diese Verschiebung unter Berücksichtigung des Verhältnisses von POPC/POPS zu Cholesterin von 70:30 bei einem Wert von 30 mN/m so sollte der Wert statt den beobachteten  $65.7 \text{ \AA}^2$  für POPC/POPS-Schichten  $82.8 \text{ \AA}^2$  betragen. Dieser Wert ergibt sich, wenn man annimmt, daß bei jedem dritten von sieben Phospholipiden die Fläche pro Molekül um die Fläche eines Cholesterin-Moleküls ( $40 \text{ \AA}^2$ ) vergrößert wird. Die aus der Isotherme bestimmte Fläche pro Molekül liegt bei 30 mN/m mit  $72.1 \text{ \AA}^2$  etwa  $10 \text{ \AA}^2$  niedriger als der theoretisch bestimmte Wert. Dies ist auf einen kondensierenden Effekt des Cholesterins auf die Lipidmonoschicht zurückzuführen.

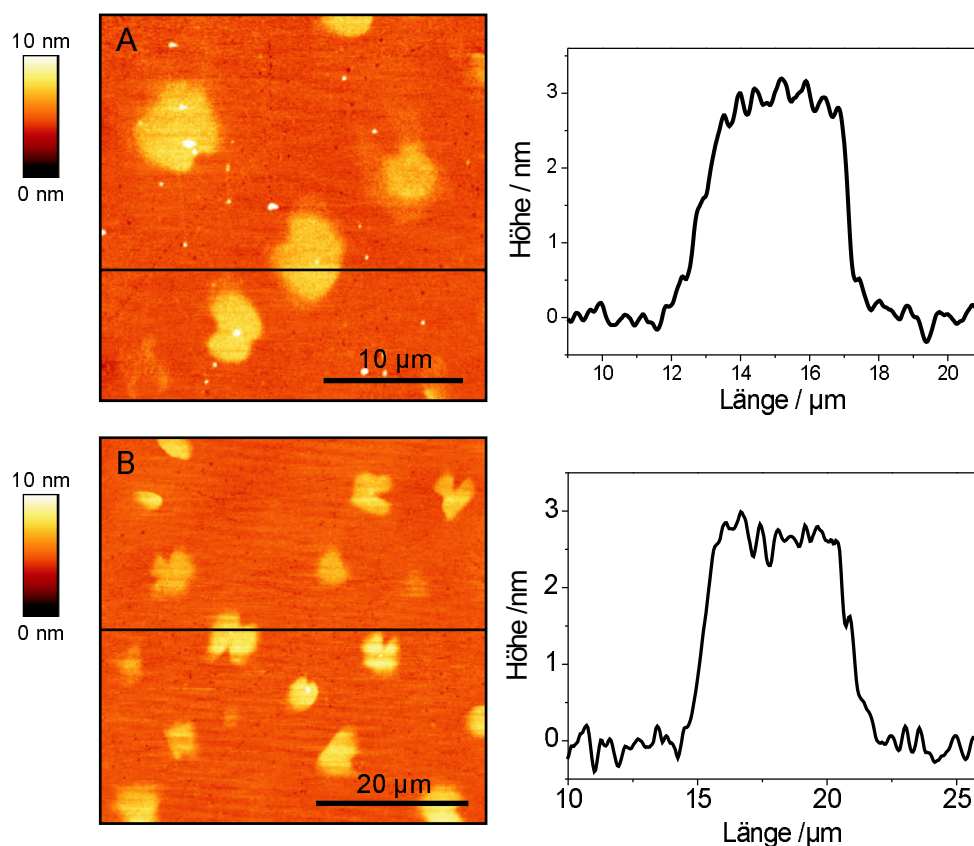
#### 4.3.5 Einfluß der p11 - Wechselwirkungen mit membrangebundenem Annexin A2m

Die Assoziation des Annexin A2 mit dem spezifischen Proteinliganden p11 beeinflusst offensichtlich entscheidend die Eigenschaften und Funktionen des Annexins *in vitro* und *in vivo*<sup>[25,45]</sup>. Vor allem die Lokalisation des Annexin A2 innerhalb der Zelle ist von der Assoziation mit dem S100-Liganden abhängig. Es ist daher bedeutend, den Einfluß der p11-Bindung auf die biochemischen Eigenschaften des Annexin A2 bzw. das Zusammenspiel von p11- und Membranbindung des Annexin A2 zu charakterisieren, um ein besseres Verständnis für die zellulären Aufgaben des Annexin A2 zu erlangen.

##### p11 - Interaktion mit Annexin A2m an DPPC/DPPS - Membranen

Mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie soll gezeigt werden, ob das p11 mit Annexin A2m interagiert, das an eine Lipidmembran gebunden ist. Da eine erfolgte Komplexbildung in diesem Fall über den Höhenunterschied des Annexin A2m und Annexin A2t nachgewiesen werden soll, bieten sich DPPC/DPPS-Lipidmembranen als Modellsystem an. Auf diesen in der Gel-Phase befindlichen Lipiddoppelschichten ist das monomere Annexin eindeutig aufgrund seiner Höhe von dem heterotetrameren Proteinkomplex zu unterscheiden (Abschnitt 4.10).

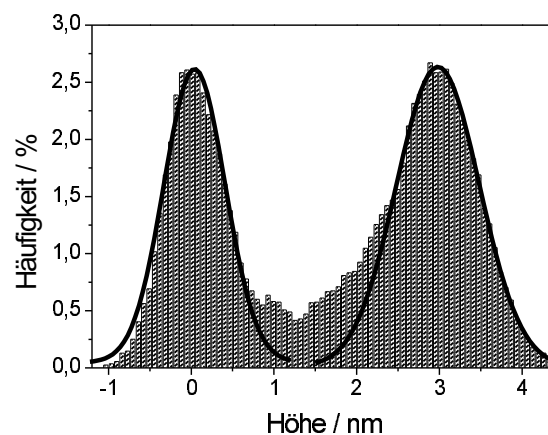
Zunächst wird Annexin A2m ( $c = 0.4 \mu\text{M}$ ) in Gegenwart von  $1 \text{ mM CaCl}_2$  an eine DPPC/DPPS (4:1)-Oberfläche gebunden ( $20 \text{ mM Tris/HCl}$ ,  $\text{pH } 7.4$ ,  $100 \text{ mM NaCl}$ ,  $1 \text{ mM NaN}_3$ ). In Abbildung 4.49 (A) ist die Annexin A2m-Bindung an die DPPS-reichen Domänen in Form von hellen Bereichen sichtbar, die einen Höhenunterschied von etwa  $2.7 - 3 \text{ nm}$  aufweisen.



**Abb. 4.49:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahme von Annexin A2m auf einer DPPC/DPPS (4:1)-Membranoberfläche im *intermittent contact*-Modus vor (A) und (B) nach Zugabe von p11 in Anwesenheit von  $1 \text{ mM CaCl}_2$  ( $20 \text{ mM Tris/HCl}$ ,  $\text{pH } 7.4$ ,  $100 \text{ mM NaCl}$ ,  $1 \text{ mM NaN}_3$ ).

Nachdem nicht-gebundenes Annexin A2m aus der überstehende Probenlösung durch mehrfachen Austausch des Puffers entfernt wurde, erfolgt eine 30 minütige Inkubation der Probe mit  $0.6 \mu\text{M p11}$ . Danach wird ebenfalls durch wiederholten Pufferaustausch in Lösung befindliches Protein entfernt. In Abbildung 4.49 (B) ist die topographische Aufnahme einer von Proteindomänen nach

der Zugabe von p11 gezeigt. Aus dem zugehörigen Höhenprofil läßt sich ein Höhenunterschied von etwa 2.7 nm ablesen. Aus  $n = 19$  Histogrammanalysen über einzelne Proteindomänen ergab sich ein Höhenunterschied von  $(2.6 \pm 0.3)$  nm. In Abbildung 4.50 ist ein typisches Histogramm gezeigt. Es sind zwei voneinander getrennte Peaks sichtbar, die der Lipiddoppelschicht und dem Protein zugeordnet werden. Im Diagramm sind zwei Gaußkurven an die Daten angepaßt, deren Maxima zur Höhendifferenzbestimmung herangezogen wurden.



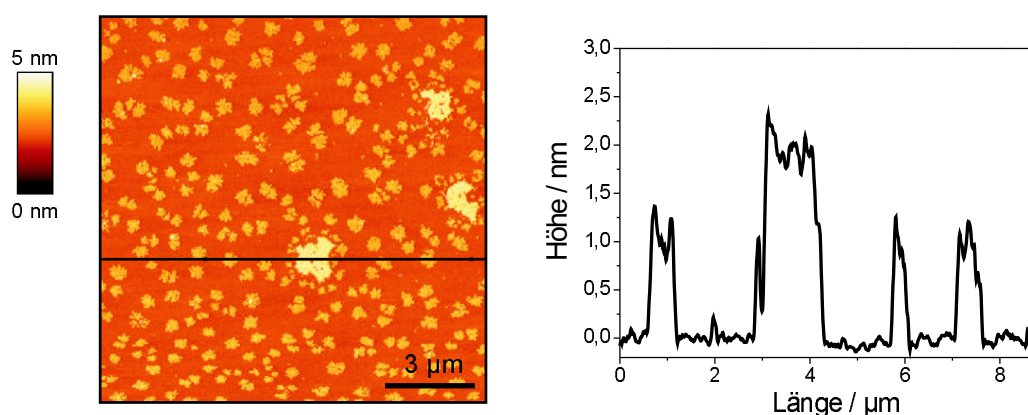
**Abb. 4.50:** Typisches Höhenhistogramm einer Proteindomäne nach Inkubation der Probe mit p11.

#### **Annexin A2m - p11 - Wechselwirkungen an POPC/POPS - Membranen**

In dem beschriebenen Experiment ließ sich keine Höhenänderung des membrangebundenen Annexin durch Zugabe von p11 feststellen. Daraus läßt sich schließen, daß keine Annexin A2t - Komplexbildung stattfindet, wenn das Annexin A2m an eine DPPC/DPPS - Schicht gebunden ist. Es wäre denkbar, daß dies an der Anordnung des Annexins auf den vorgeformten DPPS - reichen Domänen liegt. Daher sollten vergleichende Messungen auf POPC/POPS - Schichten durchgeführt werden, da hier eine größere laterale Beweglichkeit des Systems gegeben ist. Außerdem ist es von Interesse, ob eine Komplexbildung von Annexin und p11 gegebenenfalls nachträglich einen Einfluß auf die laterale Verteilung des Proteins auf der Oberfläche hat. Da das Annexin A2m und Annexin A2t im *contact* - Modus

nicht innerhalb der Fehler über ihre Höhendifferenz zur Lipidschicht unterschieden werden können, wurden die hierzu durchgeführten Messungen im *intermittent contact*-Modus durchgeführt. Zunächst wurde in Anwesenheit von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  Annexin A2m an eine POPC/POPS (4:1)-Membran gebunden und die Probe anschließend mit 0.6  $\mu\text{M}$  p11 versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde die überstehende Probenlösung durch mehrfachen Pufferaustausch erneuert. In Abbildung 4.51 ist eine topographische Aufnahme der Probenoberfläche gezeigt.

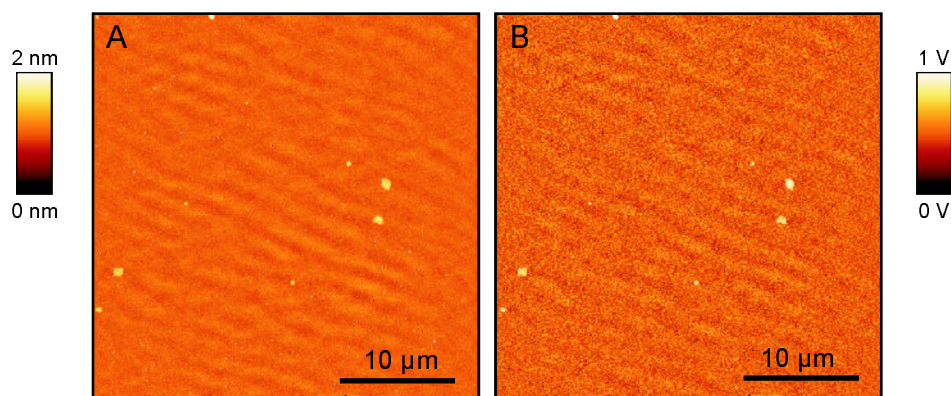
Die hellen, höheren Domänen entsprechen in Größe und Form den zuvor be-



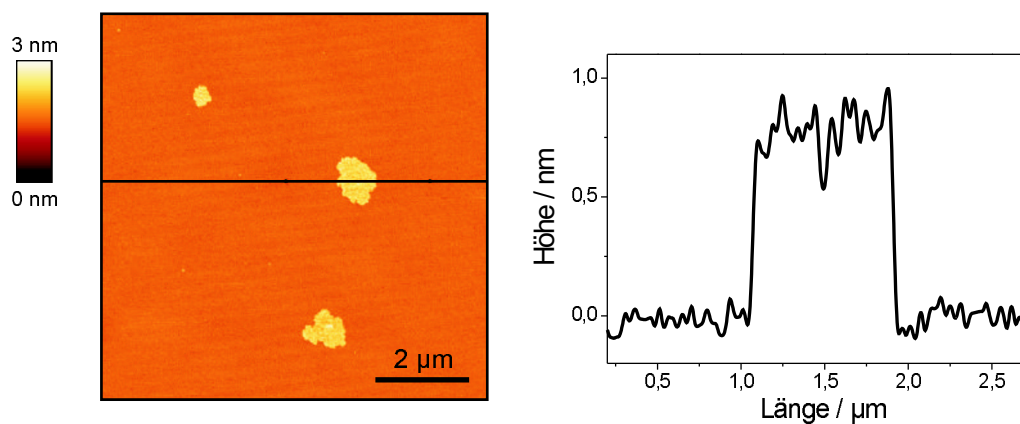
**Abb. 4.51:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahme von Annexin A2m auf einer POPC/POPS (4:1)-Membranoberfläche im *intermittent contact*-Modus nach Zugabe von p11 in Anwesenheit von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ).

schriebenen Annexin A2m-Domänen (siehe Abschnitt 4.3.3). Zudem sind noch kleinere, niedrigere Domänen zu beobachten, die über die Probenoberfläche verteilt sind. Aus dem nebenstehenden Höhenprofil, welches entlang der eingezeichneten Linie aufgenommen wurde, lässt sich ein Höhenunterschied zwischen der Lipidmembran und den größeren, höheren Proteindomänen von 1.8 nm ablesen (Abb. 4.51). Eine Histogrammanalyse war für diese Domänen aufgrund der umgebenden kleineren Domänen nicht möglich. Für die kleineren Domänen lässt sich ein Höhenunterschied von 1 nm aus dem Höhenprofil bestimmen. Histogrammanalysen von  $n = 10$  einzelnen Domänen ergeben eine Höhendifferenz zwischen Protein- und Lipidschicht von  $(1.1 \pm 0.1)$  nm.

Da sich aufgrund dieser Beobachtungen die Frage stellte, ob es sich bei den nach der p11-Zugabe visualisierten kleinen Domänen um p11 handeln könnte, wurde eine POPC/POPS-Membran in Abwesenheit von Annexin A2m für 30 min mit  $0.6\ \mu\text{M}$  p11 inkubiert. In Abbildung 4.52 ist eine topographische Aufnahme (A) einer solchen Oberfläche mit dem zugehörigen Phasensignal (B) gezeigt. Es sind vereinzelt helle,  $1\ \mu\text{m}$  große Domänen zu sehen, die im Phasensignal (B) einen deutlichen Kontrast zur Lipiddoppelschicht bilden.

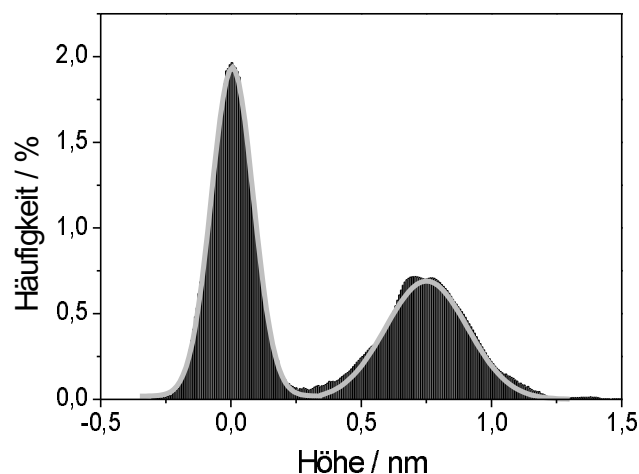


**Abb. 4.52:** Topographische Aufnahme (A) einer POPC/POPS (4:1) Membranoberfläche im *intermittent contact*-Modus und entsprechendes Phasensignal (B) nach Zugabe von p11 (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{NaN}_3$ ).



**Abb. 4.53:** Vergrößerung einer p11-Proteindomänen mit entlang der eingezeichneten Linie aufgenommenem Höhenprofil.

Aus dem Höhenprofil der topographischen Vergrößerung in Abbildung 4.53 kann man einen Höhenunterschied von etwa 0.7 nm ablesen. Dies entspricht dem Höhenunterschied von  $(0.7 \pm 0.1)$  nm, der als Differenz der jeweiligen Peakmaxima in den Histogrammdateien bestimmt wurde. In Abbildung 4.54 ist die Höhe der Lipidschicht als Referenz auf 0 nm gesetzt worden.



**Abb. 4.54:** Typisches Histogramm zur Höhenbestimmung einer p11-Domäne.

### 4.3.6 Diskussion

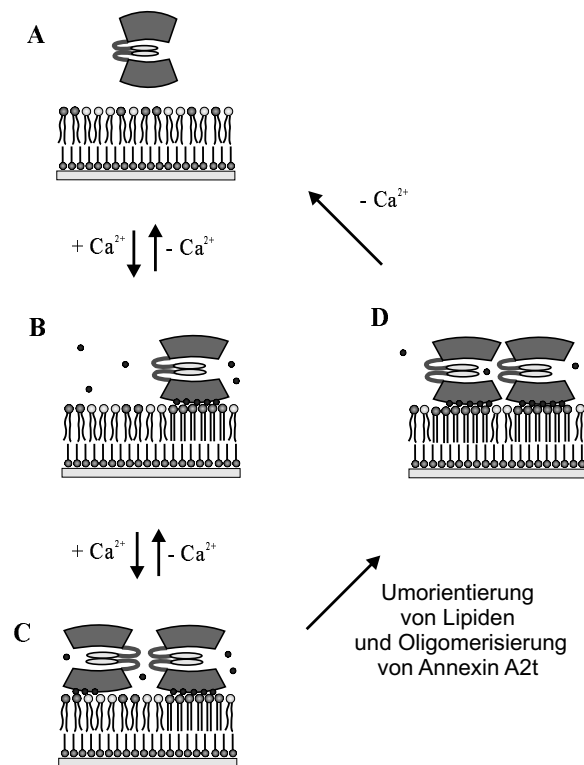
Bei den Bestrebungen, die zellulären Vorgänge zu verstehen, an denen Annexin A2 beteiligt ist, gibt es immer deutlichere Hinweise, daß die laterale Organisation des Annexin A2t auf Membranoberflächen für die funktionellen Aufgaben des Proteinkomplexes von entscheidender Bedeutung zu sein scheint. So ist Annexin A2 an der Membran früher Endosomen nicht homogen verteilt, sondern in definierten Bereichen lokal konzentriert, an die zum Teil Actin-Filamente des Cytoskeletts assoziiert sind<sup>[27]</sup>. Auch an der Plasmamembran liegt das Protein lateral organisiert an Cholesterin-reiche Mikrodomänen gebunden vor, die mit dem darunterliegenden Cytoskelett verknüpft sind<sup>[27]</sup>. Da bisher jedoch die Frage ungeklärt blieb, ob das Annexin A2 für eine Organisation der Membranstrukturen verantwortlich ist, sollte die laterale Anordnung des Proteins auf einer Lipidmembran im Rahmen dieser Arbeit visualisiert und charakterisiert werden. Das einfache Modellsystem einer festkörperunterstützten Membran mit 20 % negativ-geladenem Lipid bietet hierbei die Möglichkeit, die Anordnung des Annexin A2 auf einer Membranoberfläche in Abhängigkeit der Annexin-Lipid- bzw. der Annexin-Annexin-Wechselwirkungen zu ergründen. Da die beschriebenen Funktionen an Verknüpfungspunkten zellulärer Membranen, soweit bekannt, ausschließlich von dem heterotetrameren Annexin A2t-Komplex übernommen und nicht durch das monomere Annexin A2m allein erfüllt werden können, lag ein Schwerpunkt der Fragestellung dieser Arbeit auf dem Vergleich von monomerem und heterotetramerem Annexin A2.

In den durchgeführten  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Titrationsexperimenten zur Reversibilität der Annexin A2m-Membranbindung wurde ein zweistufiger Desorptions- bzw. Adsorptionsprozeß an festkörperunterstützte POPC/POPS-Membranen beobachtet. Dabei zeigt die erste Desorptionsstufe einen nicht-kooperativen Charakter, während die zweite Desorption mit einem Hill-Koeffizienten von  $n = 3$  mit hoher Kooperativität abläuft. Mit typischen Hill-Koeffizienten von  $n = 3 - 5$  wurde auch für andere Annexin-Membranbindungen ein kooperativer Verlauf der  $\text{Ca}^{2+}$ -Titrationen gefunden<sup>[128-130]</sup>. Der entscheidende Unterschied in den Ti-

trationsverläufen zwischen dem Annexin A2m und A2t liegt darin, daß für das Annexin A2t eine signifikant große Hysterese zwischen den Hin- und Rücktitrationskurven zu beobachten ist, während die beiden Titrationskurven des Annexin A2m lediglich in geringem Maße relativ zueinander verschoben sind. Um die Ergebnisse der durchgeführten Annexin A2m-Titrationskurven mit denen des heterotetrameren Annexin A2t leichter vergleichen zu können, ist in Abbildung 4.55 das von Ross et al. aufgestellte Modell für die Membraninteraktionen des Annexin A2t dargestellt<sup>[35]</sup>.

Das Modell soll den Ablauf eines Titrationsexperiments in einzelnen Schritten verdeutlichen. Zunächst wird das Annexin A2t in EGTA-haltiger Lösung zu einer festkörperunterstützten OT-POPC/POPS-Membran gegeben (A), worauf keine oder nur eine geringfügige Bindung erfolgt. Durch Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration kommt es zur Ausbildung von Bereichen mit lokal hoher PS-Konzentration, an die das Annexin A2t bei einem Hill-Koeffizienten von  $n = 3 - 4$  mit hoher Kooperativität bindet ( $A \rightarrow B$ )<sup>[78]</sup>. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration für eine halbmaximale Bindung liegt für diesen Prozeß im nanomolaren Bereich. Die hohe Kooperativität wurde von Ross durch die Ausbildung stabiler Annexin- $\text{Ca}^{2+}$ -Lipid-Komplexe erklärt, die durch die lokal hohe Konzentration der PS-Lipide der hoch affinen Bindungsplätze ermöglicht wird<sup>[78]</sup>. Die Wechselwirkungen werden dabei vermutlich über eine Bindungsstelle für PS-Lipide in der Kerndomäne des Annexin-Moleküls vermittelt, wie sie für Annexin A5 in Simulationen vorhergesagt wurde<sup>[131]</sup>. Wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration weiter erhöht, so bindet das Annexin A2t an weniger affine Bindungsplätze (C). Dieser Bindungsprozeß erfolgt nicht kooperativ ( $n = 1$ ) mit halbmaximaler Bindung bei mikromolaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Durch die Proteinbindung kommt es aufgrund von Protein-Protein- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen zu einer lateralen Aggregation des Annexin A2t und einer lateralen Umorganisation der negativ-geladenen Lipide ( $C \rightarrow D$ ). Die Rekrutierung der PS-Lipide zusammen mit der Oligomerisierung der Annexin A2t-Moleküle resultiert in der Ausbildung hoch affiner Bindungsplätze, worauf nur noch ein einstufiger Desorptionsprozeß zu beobachten ist ( $D \rightarrow A$ ).





**Abb. 4.55:** Modell der Interaktion von Annexin A2t mit Membranen verändert nach Ross<sup>[35]</sup>. Schematisch sind festkörperunterstützte OT-POPC/POPS-Membranen dargestellt, wie sie für die QCM-Messungen verwendet werden. Die verschiedenen Zustände erläutern eine Annexin-abhängige Umorientierung der negativ-geladenen PS-Lipide. Durch die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bilden sich PS-reiche Bindungsstellen, an die das Annexin A2t kooperativ und mit hoher Affinität bindet (A→B). Bei weiterer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bindet das Annexin nicht-kooperativ an niedrig-affine Bindungsstellen (B→C). Nach einer Umorientierung der Lipide zu hoch affinen Bindungsstellen (C→D) ist ein im Wesentlichen einstufiger Desorptionsprozeß zu beobachten (D→A).

Vergleicht man die Titrationskurven des Annexin A2m mit diesem Modell, so läßt sich die lediglich gering ausgeprägte Hysterese nur damit erklären, daß monomeres Annexin A2 nicht in dem Maße zur lateralen Selbstaggregation und zu einer Umorganisation der Lipide in der Lage ist wie der tetramere Proteinkomplex. Die Adsorption des Annexin A2m erfolgt analog zu dem für das Annexin A2t beschriebenen Verlauf zunächst kooperativ an hoch affine Bindungsstellen und dann in

einem weiteren, nicht - kooperativen Schritt an niedrig affine Bindungsstellen. Die im ersten Adsorptionsprozeß beobachtete Kooperativität ist mit  $n = 3$  tendenziell etwas niedriger als die für das Annexin A2t beschriebene. Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß das Annexin A2t wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt mit beiden Annexin-Molekülen an die Membran bindet. Außerdem deutet die niedrigere Kooperativität eine geringere Selbstassoziation des Annexin A2m im Vergleich zum Annexin A2t an. Die halbmaximale Bindung dieses ersten Adsorptionsschrittes des Annexin A2m an die Membran erfolgt mit einem  $K_{0.5}$ -Wert von 285 nM im Rahmen der Fehler im gleichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsbereich wie für das Annexin A2t beobachtet<sup>[78]</sup>. Für den zweiten Adsorptionsprozeß liegt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration für eine halbmaximale Proteinbindung bei  $K_{0.5} = 210 \mu\text{M}$ , was in etwa sieben Mal so hoch ist wie für das Annexin A2t beschrieben. Während die Adsorption von monomerem und tetramerem Annexin A2 an hoch affine Bindungsstellen in etwa mit der gleichen Affinität stattfindet, bindet das Annexin A2t bereits bei niedrigeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen an niedrig affine Bindungsstellen. Dies läßt sich mit der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen molekularen Anordnung des Annexin A2t auf der Membranoberfläche erklären. Da das Annexin A2t mit zwei Annexin-Molekülen an die Membran bindet, wird eine bessere Interaktion mit der geringeren lokalen Anzahl an PS-Lipiden in den niedrig affinen Bindungsstellen ermöglicht.

Da die Desorption des Annexin A2m, ebenso wie die Adsorption, in einem zweistufigen Prozeß verläuft, ist anzunehmen, daß monomeres Annexin A2m nicht in dem Maße wie Annexin A2t in der Lage ist, laterale Selbstassoziationen einzugehen und eine Umorganisation der PS-Moleküle zu induzieren. So findet im Gegensatz zum einstufigen Desorptionsprozeß des Annexin A2t mit abnehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zunächst eine nicht - kooperative Ablösung des Annexin A2m von den niedrig-affinen Bindungsstellen statt, worauf die Desorption von den durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen induzierten hoch-affinen Bindungsstellen folgt. Dies entspricht den gefundenen experimentellen Daten aus den  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Titrationskurven. Das Annexin A2m induziert also scheinbar nur geringfügig die laterale Umorganisation zu hoch affinen Bindungsstellen (Abb. 4.55). Eine ge-

wisse Tendenz zu einem Umorientierungsprozeß läßt sich jedoch feststellen, da der relative intermediäre Belegungsgrad der Adsorptionskurve bei  $\Theta' = 0.54$  liegt während dieser Wert für die Desorption bei  $\Theta' = 0.71$  beträgt. Dieser Unterschied bedeutet, daß mehr Annexin A2m an niedrig affine Bindungsstellen adsorbiert als in der EGTA-Titration desorbiert, was laut Modell mit einer Umorganisation zu hoch affinen Bindungsstellen zu erklären ist. Die  $K_{0.5}$ -Werte, die die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der halbmaximalen Proteinbindung angeben liegen innerhalb der Fehler für die Adsorptions- und Desorptionstitration im gleichen Bereich. Die erste Adsorptions- bzw. die zweite Desorptionsstufe an hoch affine Bindungsplätze erfolgt mit einem  $K_{0.5} = (199 \pm 33) \text{ nM}$  bzw.  $K_{0.5} = (285 \pm 57) \text{ nM}$  im nanomolaren Bereich, während die Adsorption bzw. Desorption an niedrig affine Bindungsplätze mit einem  $K_{0.5} = (140 \pm 40) \mu\text{M}$  bzw.  $K_{0.5} = (210 \pm 70) \mu\text{M}$  im mikromolaren Bereich erfolgt. Die in der Literatur bestimmten  $K_{0.5}$ -Werte für eine halbmaximale Annexin A2m-Bindung wurden über Liposomenbindungstests ermittelt und liegen bei  $0.65 \mu\text{M}^{[132]}$ ,  $15 \mu\text{M}^{[18]}$  oder  $45 \mu\text{M}^{[133]}$ . Der Unterschied dieser und der in dieser Arbeit beschriebenen  $K_{0.5}$ -Werte liegt vermutlich darin, daß in den Liposomentests der zweistufige Prozeß nicht beobachtet werden kann, was zu einer Mittelung aus beiden Werten führt. Im Gegensatz zu Vesikelbindungstests konnten im Fall der festkörperunterstützten Lipidschicht etwa 35% des gebundenen Proteins nicht durch EGTA-Zugabe von der Membran gelöst werden, was möglicherweise auf eine eingeschränkte laterale Beweglichkeit der Lipide auf dem Festkörper und die Ausbildung lateraler Komplexe zurückzuführen ist. Außerdem könnte eine unspezifische, irreversible Proteinadsorption an Defektstellen erfolgt sein.

Die aus den Quarzmikrowaagemessungen vermutete Tendenz des Annexin A2t zur lateralen Aggregation in Zusammenhang mit der Umorganisation von negativ-geladenen Phospholipiden konnte durch die im Folgenden diskutierten Ergebnisse der bildgebenden Methoden bestätigt werden. Dabei muß berücksichtigt werden, daß aufgrund der Vorgehensweise bei den rasterkraftmikroskopischen Messungen im Gegensatz zu den Titrationsexperimenten nur der irreversibel an die Membran gebundene Anteil des Annexins beobachtet wird. Quarzmikrowaage-

messungen in denen zunächst Annexin A2t in Anwesenheit von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  an die Membran gebunden wurde und dann reversibel- und nicht-gebundenes Protein durch spülen mit Puffer aus der Probe entfernt wurde, zeigten daß der prozentuale Anteil an irreversibel gebundenem Annexin A2 bei über 80% lag<sup>[134]</sup>.

Bevor die gewonnenen Erkenntnisse über die Bindung des Annexins auf der Oberfläche diskutiert werden, soll zunächst auf das Phasenverhalten der verwendeten Lipidschichten eingegangen werden. Mittels Rasterkraftmikroskopie konnte in dieser Arbeit erstmals eine Phasenseparation in Form von ca. 100 nm großen Domänen in dem Lipidsystem POPC/POPS (4:1) direkt visualisiert werden. Da die verwendeten Lipide sich bei der gegebenen Temperatur von 20 °C beide in der fluiden  $L_\alpha$ -Phase befinden, wäre zunächst aufgrund gleicher Kettenlänge, eine vollständige Mischbarkeit zu erwarten gewesen. Daß trotz gleicher Kettenlänge der Lipide zwei Phasen in der Topographie je nach applizierter Kraft einen Höhenunterschied von 0.4-1 nm aufweisen, läßt auf eine weniger starke Deformierbarkeit der PS-Lipiddomänen im Vergleich zur Umgebung schließen. Diese Beobachtungen lassen sich durch eine Komplexierung der negativ-geladenen PS-Kopfgruppen durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen erklären<sup>[135,136]</sup>, wodurch es zu einer lokalen Anreicherung von PS-Lipiden in Form der beobachteten Domänen kommt. Die Verbrückung der Kopfgruppen hat zudem den Effekt, daß sich die PS-reiche Phase aufgrund der lateralen Wechselwirkungen in einem festeren Zustand befindet als die POPC-reiche Umgebung. Der Vergleich von POPS-Isothermen an der Luft/Wasser-Grenzfläche zeigt, daß durch die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die Fläche pro Molekül in einer komprimierten Lipid-Monolage von ca.  $64 \text{ \AA}^2$  auf  $57 \text{ \AA}^2$  abnimmt, was auf einen kondensierenden Effekt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf die PS-Kopfgruppen zurückzuführen ist<sup>[137]</sup>. Auch zahlreiche andere Studien zeigen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Phasenseparation<sup>[138,139]</sup> und teilweise Verfestigung von PS-Lipiden in PS/PC-Mischungen<sup>[140-142]</sup>. Hierbei muß jedoch berücksichtigt werden, daß meistens Lipidmischungen unterschiedlicher Kettenlängen betrachtet wurden. So konnten z.B. Reviakine et al. an Hand rasterkraftmikroskopischer Aufnahmen zeigen, daß die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die Mischbarkeit von DOPS mit in Gel-Phase befindlichem DPPC erhöht<sup>[142]</sup>.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Phasenseparation von PC- und PS-Lipiden gleicher Kettenlänge wurde bereits für DPPC/DPPS (4:1)-Schichten beobachtet, wobei in diesem Fall jedoch kein Höhenunterschied der coexistierenden Phasen detektierbar war<sup>[110]</sup>. Da sich beide Lipide bei Raumtemperatur in der Gelphase befinden, bewirkt die laterale Aggregation der Kopfgruppen durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in diesem Fall keinen nennenswerten Unterschied innerhalb der bereits relativ geringen Deformierbarkeit der Lipidschicht. Huang et al. simulierten die laterale Verteilung von POPS in Mischungen mit verschiedenen PC-Komponenten und fanden keine ideale Mischbarkeit der Lipide, sondern eine bevorzugte Interaktion der Lipide mit gleichartiger Kopfgruppe<sup>[143]</sup>. Interessanterweise war die lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an den PS-reichen Aggregaten höher als die mittlere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an der Oberfläche, wodurch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Verknüpfung der negativ-geladenen Kopfgruppen bestätigt und die Abschirmung der repulsiven Kräfte zwischen den gleich-geladenen Lipiden erklärt wird. Experimentelle Hinweise zur Phasenseparation negativ-geladener Dioleoylphosphatidylsäure in Dioleoylphosphatidylcholin-Vesikeln ergaben sich aus Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie-Aufnahmen, in denen in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen separierte Domänen beobachtet werden konnten<sup>[135]</sup>. In Untersuchungen zur lateralen Diffusion in POPC/POPG-Vesikeln wurden zwei PC-Fraktionen mit unterschiedlichen Diffusionskonstanten beschrieben<sup>[126]</sup>. Dies kann ebenfalls als Hinweis auf eine Phasenseparation gedeutet werden, wenn man davon ausgeht, daß PC-Lipide, die sich in PG-reichen Domänen befinden, mit einer anderen Geschwindigkeit diffundieren als Lipide der PC-Matrix. In den hier beschriebenen Lipidschichten konnte interessanterweise keine Diffusion der PS-reichen Lipiddomänen beobachtet werden. Diese laterale Immobilisierung der phasenseparierten Domänen ist möglicherweise durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Verbrückung der PS-Kopfgruppen mit der negativ-geladenen Glimmeroberfläche zu erklären. Richter et al. beschrieben kürzlich den Einfluß des Substrates auf die Verteilung negativ-geladener DOPS-Moleküle in den beiden Monolagen einer festkörperunterstützten Membran<sup>[144]</sup>. Dabei zeigte der Vergleich zwischen Silizium und Glimmer als Substrat, daß bei der Präparation einer Lipiddoppelschicht durch Spreiten

unilamellarer DOPC/DOPS - Vesikel auf Glimmer DOPS - Moleküle in der unteren Lipidschicht angereichert werden. Bei einem DOPC/DOPS - Verhältnis von 4:1 sind laut Richter et al. nur etwa 7 % des negativen DOPS in der oberen Membranhälfte für Interaktionen mit Proteinen zugänglich. Erste fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Annexin A2t - Bindung auf einer POPC/POPS (4:1) - Lipiddoppelschicht, die auf einem Glassubstrat immobilisiert wurde, zeigen eine vollständige Belegung der Oberfläche mit Protein. Dies bestätigt die Annahme, daß Glimmer eine Ungleichverteilung des negativ - geladenen POPS in den beiden Membranhälften induziert. Feigerson beschreibt die Bildung von stabilen  $\text{Ca}^{2+}$  - PS - Komplexen, die sich nur bilden, wenn eine Komplexierung der  $\text{Ca}^{2+}$  - Ionen durch mehrere PS - Moleküle in zwei gegenüberliegenden Lipidschichten erfolgt<sup>[145]</sup>. In dem Fall der festkörperunterstützten Membran auf Glimmer könnte das Substrat als zweite Membran fungieren und so eine Bildung von  $\text{Ca}^{2+}$  - PS - Komplexen fördern. Geht man davon aus, daß die PS - reichen Domänen mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops erst ab einer bestimmten Größe und Festigkeit abbildbar sind, wird man die PS - Moleküle in der oberen Schicht vermutlich nicht abbilden können. Dies bedeutet nicht, daß in der oberen Membranhälfte eine ideale Mischbarkeit angenommen werden kann, sondern das die lateralen Aggregate in dieser Schicht aufgrund ihrer Größe bzw. mangelnden Festigkeit nicht visualisiert werden können. Bei den beobachteten PS - Domänen handelt es sich wahrscheinlich um eine Anordnung, in der die negativ - geladenen Moleküle auf der unteren Membranseite lokalisiert und durch Interaktion mit dem Substrat lokal konzentriert und immobilisiert sind. Dies würde auch erklären, daß die Annexin - Bindung unabhängig von der Tatsache war, ob in der jeweils betrachteten Lipidschicht PS - Aggregate sichtbar waren oder nicht, da für die Proteinbindung an der Membranoberfläche primär die PS - Moleküle der oberen Membranhälfte verantwortlich sind.

Die laterale Verteilung von Annexin A2t auf einer POPC/POPS (4:1) - Doppelschicht wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Fluoreszenzmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie visualisiert und charakterisiert. Es zeigte sich, daß die

Annexin-Moleküle nicht homogen auf der Probenoberfläche verteilt, sondern in Domänen unterschiedlicher Größe gebunden waren, die ca. 11 % der gesamten Oberfläche belegten. Für Annexin A2m konnte ebenfalls eine nicht-homogene Verteilung des Proteins auf der Membranoberfläche visualisiert werden, wobei die beobachteten Proteinaggregate etwa 8 % der Fläche bedeckten. Die Größenverteilung der visualisierten Proteindomänen wurde mittels Pixelanalyse bestimmt, wobei eine Verringerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Fall des Annexin A2t zu einer Verringerung des Anteils an großen Proteindomänen führte. Ein Vergleich der Domänengrößenverteilung zwischen monomerem und tetramerem Annexin A2 verdeutlicht, daß die Tendenz zur lateralen Komplexbildung für das Annexin A2t ausgeprägter ist, was sich in der vermehrten Ausbildung größerer Proteindomänen widerspiegelt. Diese direkte visuelle Beobachtung bestätigt die aus den Quarzmikrowaagemessungen vermuteten Unterschiede zwischen monomerem und heterotetramerem Annexin A2, die auf eine ausgeprägtere laterale Umorganisation negativ-geladener Lipide und Oligomerisierung des Annexin A2t in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zurückzuführen sind. Innerhalb der Annexin-Familie wurde die Tendenz zur lateralen Assoziation bereits für verschiedene Annexine in Lösung<sup>[146]</sup> aber vor allem als Folge der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Membranbindung beobachtet<sup>[147–149]</sup>. Für Annexin A5 konnte mittels Rasterkraftmikroskopie sogar ein direktes Kristallwachstum auf einer DOPC/DOPS (4:1)-Doppelschicht gezeigt werden<sup>[150,151]</sup>, wobei in einem Kristall jeweils drei Annexin-Moleküle zu einem Trimer zusammengelagert sind<sup>[152,153]</sup>. Pigault et al. beschreiben aufgrund von UV-spektroskopischen Daten ein Modell für die Membranbindung des Annexin A5, das auf Annexin-Lipid und Annexin-Annexin-Wechselwirkungen basiert<sup>[154]</sup>. Darin binden zunächst Annexin-Moleküle  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an negativ-geladene PS-Lipide. An diese "Kristallisationskeime" assoziieren dann über Protein-Protein-Interaktionen weitere Annexin-Moleküle, was zu einer Ausbildung zwei-dimensionaler Aggregate führt. Diese Hypothese würde das Auftreten lateraler Aggregate auf der Membranoberfläche und den in den Titrationsexperimenten beobachteten zweistufigen Desorptionsprozeß des Annexin A2 erklären und ist im Wesentlichen ähnlich zu dem von Ross et al. vorgeschlagenen Mo-

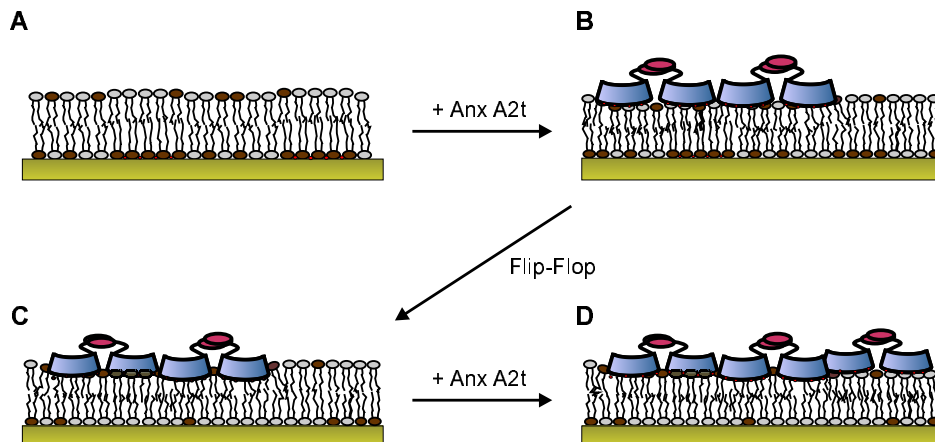
dell. Allerdings ist in dem über die UV-spektroskopischen Daten ermittelten Ablauf der Annexin-Membranbindung die Umorganisation negativ-geladener Phospholipide nicht berücksichtigt. In den vorgestellten Ergebnissen konnte jedoch eindeutig eine Verarmung an PS-Lipiden rund um größere Annexin A2t-Aggregate nachgewiesen werden. Diese Verarmung läßt auf eine Rekrutierung der negativ-geladenen Lipide unter die gebundenen Annexin A2t-Moleküle und somit auf eine Umorganisation in der Lipidverteilung aufgrund von Annexin-Lipid-Wechselwirkungen schließen. Eine Annexin-induzierte Aggregation und damit verbundene Einschränkung der lateralen Diffusion negativ-geladener PG-Lipide in PC/PG-Vesikeln wurde für Annexin A4 beschrieben<sup>[126]</sup>. Hierbei wurde für die laterale Annexin-PG-Komplexbildung mit durchschnittlich 17 PG-Molekülen pro Annexin eine lokale Anreicherung nicht aber eine Bildung reiner PG-Domänen vorgeschlagen<sup>[127]</sup>. Hinderliter et al. beschrieben den Einfluß einer reversiblen Proteinbindung auf das Phasenverhalten von Phosphatidylserin-Lipiden in PC/PS-Mischungen anhand von MonteCarlo-Simulationen und fluoreszenzspektroskopischen Messungen<sup>[136, 155, 156]</sup>, wobei als Grundlage der Betrachtungen eine nicht-ideale Mischung der Lipide in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen angenommen wurde<sup>[136, 143]</sup>. Es zeigte sich, daß spezifische Protein-Lipid- und Lipid-Lipid-Wechselwirkungen zu einer lokalen Ansammlung der entsprechenden Lipid-Spezies führen, wodurch wiederum bevorzugt Proteinmoleküle an dieser Stelle binden, die wiederum Lipide in ihrer Umgebung rekrutieren. Auf diese Weise kommt es zur Bildung von Proteindomänen auf der Membranoberfläche. Obwohl in den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten rasterkraftmikroskopischen Abbildungen nur irreversibel-gebundenes Protein abgebildet wird, können die Protein-Lipid- und Lipid-Lipid-Wechselwirkungen ein Grund für die beobachtete Domänenbildung des Annexins sein. Im Fall des Annexin A2t könnte die spezifische Bindung des Annexins an PS-Moleküle im Zusammenhang mit PS-PS-Interaktionen, die vermutlich über die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vermittelt werden, eine laterale Umorganisation bzw. Aggregation der Lipide bewirken. Dieser Vorgang resultiert in der Bindung in Form der beobachteten Proteindomänen auf der Oberfläche. In diesem Mechanismus liegt eventuell auch die Erklärung dafür, daß



das monomere Annexin A2 weniger Tendenz zur Ausbildung lateraler Aggregate zeigt als das Annexin A2t, da das Annexin A2t mit zwei Membranbindungsstellen in der Lage ist weitreichendere Interaktionen mit den Lipiden auf der Oberfläche einzugehen. Zudem wäre es denkbar, daß die lateralen Protein-Protein-Interaktionen von Annexin A2t im Vergleich zu monomerem Annexin A2m z.B. aufgrund von p11-p11-Kontakten größer ist und so zusätzlich zur Bildung ausgehnter Proteindomänen führt. Neben den Modellen, in denen eine Proteinaggregation auf der Oberfläche aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen Protein- und Lipid-Molekülen hervorgeht<sup>[155,157]</sup>, gibt es Überlegungen, die auf einer teilweisen Insertion peripherer Membranproteine in die Lipiddoppelschicht beruhen<sup>[158,159]</sup>. Hierbei kann die elastische Deformation der Lipidmembran durch das gebundene Protein in einer lateralen Domänenbildung resultieren, wenn der Abstand der adsorbierten Teilchen in der Größenordnung der Membrandeformation liegt. Für das Annexin A2 wurde in dieser Arbeit sowohl für die monomere als auch die tetramere Form mit etwa 1.3 nm bzw. 2 nm ein wesentlich geringerer Höhenunterschied zur Membranoberfläche von POPC/POPS-Schichten gefunden als in Abschnitt 4.10 für DPPC/DPPS-Membranen beschrieben. Dies ist auf ein teilweises Eindringen der Annexin-Moleküle in die fluide, deformierbare POPC/POPS-Doppelschicht zurückzuführen, was bei der dicht-gepackten, in der Gel-Phase befindlichen DPPC/DPPS-Lipidschicht nicht möglich ist. Diese teilweise Insertion in die Lipiddoppelschicht ist womöglich eine Erklärung für die *in vitro* beobachtete Ionenkanalaktivität des Annexin A2<sup>[120]</sup> und anderer Annexine<sup>[7-9,160]</sup>, wobei die Bindung des Annexin-cores eine Deformation und damit eine Ionen-Permeabilität der Membran bewirkt<sup>[11]</sup>.

Ein weiterer Aspekt, der im Zusammenhang mit der teilweisen Insertion des Annexins in die POPC/POPS-Membran diskutiert werden muß, ist ein durch die Proteinbindung induzierter Flip-Flop der negativ-geladenen Lipide von der unteren in die obere Monolage der Lipiddoppelschicht. Wenn wie zuvor beschrieben, die PS-reichen Mikrodomänen durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Wechselwirkung der PS-Kopfgruppen mit der negativ-geladenen Glimmeroberfläche stabilisiert werden, kann die beobachtete Rekrutierung der Lipide nur durch eine Wechsel-

wirkung zwischen den PS-Lipiden der unteren Membranhälfte und den Annexin-Molekülen erklärt werden. Ein so induzierter Flip-Flop und die damit verbundene Ansammlung negativ-geladener Lipide wurde von Kabanov und Yaroslavov für die Bindung positiv-geladener Polykationen an PC/PG-Vesikel beschrieben<sup>[161,162]</sup>. Geht man davon aus, daß die PS-Moleküle der visualisierten Lipiddomänen in der unteren Hälfte der festkörperunterstützten Membran lokalisiert sind, so erklärt sich auch, daß diese trotz Zugabe ausreichender Proteinmengen nicht mit Annexin belegt sind. Nur PS-reiche Domänen der unteren Membranhälfte, bei denen es zu einer Annexin-Bindung an PS-Moleküle der Oberseite der Membran kommt und eine ausreichend große Deformation der Membran entsteht, können zu einem Flip-Flop angeregt und so unter eine Annexin-Domäne rekrutiert werden. In Abbildung 4.56 ist das für die Annexin A2-Membranorganisation vorgeschlagene Modell unter Berücksichtigung der vorgestellten Sachverhalte zusammenfassend dargestellt.



**Abb. 4.56:** Modell der Annexin A2t-induzierten PS-Rekrutierung. In einem ersten Schritt bindet das Annexin A2t an die in der oberen Lipidmonoschicht befindlichen PS-Moleküle (A→B), worauf es aufgrund von Protein-Lipid-Wechselwirkungen zu einer Rekrutierung der PS-Moleküle sowohl der oberen als auch der unteren Lipidschicht unter die gebundenen Annexin-Moleküle kommt (B→C). Zudem können Protein-Protein-Wechselwirkungen im Fall des Annexin A2t zu einer vermehrten Bindung des Proteins in Nachbarschaft zu bereits gebundenen Annexin-Molekülen führen, was in der Bildung großer lateraler Aggregate resultiert (C→D).

In einer auf Glimmer immobilisierten POPC/POPS-Membran kommt es zu einer Ansammlung der negativ-geladenen PS-Moleküle in der unteren Membranhälfte, wobei es außerdem zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Bildung PS-reicher Domänen (A) kommt. Die Adsorption von Annexin A2t führt durch eine teilweise Insertion des Proteins zu einer Deformation der Lipidschicht (B), wodurch bei einer ausreichenden Menge an gebundenem Annexin ein Flip-Flop der PS-Moleküle von der unteren in die obere Lipidlage initiiert wird (C). Protein-Protein-Wechselwirkungen können zudem noch eine Bindung von Annexin A2t an Membranbereiche mit geringem PS-Gehalt ermöglichen (D).

Da Cholesterin *in vivo* einen Einfluß auf die Assoziation des Annexin A2t mit der Plasmamembran hat, sollte der Einfluß von Cholesterin auf die Annexin A2t-Membranbindung untersucht werden<sup>[33,36]</sup>. Ross et al. konnten mit Hilfe der Quarzmikrowaage zeigen, daß Cholesterin das Ausmaß der Hysterese von Hin- und Rücktitration in  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Reversibilitätsmessungen der Annexin A2t-Membranbindung an POPC/POPS/Cholesterin (56:14:30)-Schichten im Vergleich zu POPC/POPS (80:20)-Membranen verstärkt<sup>[78]</sup>. Interessanterweise zeigte sich kaum ein Einfluß des Cholesterins, wenn das Annexin A2t zunächst in 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Puffer gebunden und schrittweise durch Zugabe EGTA-haltiger Lösung von der Lipidoberfläche abgelöst wurde. Wurde jedoch das Protein durch Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu EGTA-haltiger Lösung schrittweise an die Membran gebunden, so war in Anwesenheit von Cholesterin etwa die doppelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration für eine halbmaximale Bindung im ersten Bindungsprozeß im Vergleich zu Membranen ohne Cholesterin nötig. Aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, lassen sich diese Beobachtungen auf einen Einfluß von Cholesterin auf die Membranstruktur und damit die Art der Annexin-Bindungsplätze zurückführen. Die Anwesenheit von Cholesterin behindert scheinbar die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Bildung PS-reicher Bindungsstellen, was einen Einfluß auf die laterale Verteilung des Annexins auf einer Membranoberfläche hat. Wenn die PS-Lipide durch die Anwesenheit des Cholesterins in der Membran weniger stark lateral beweglich sind, können sich die Annexin-PS- und PS-PS-Wechselwirkungen nicht so weitreichend auswirken und die gebildeten lateralen Komplexe zeigen

eine tendenziell kleineren Durchmesser als die lateralen Proteinaggregate auf Membranen ohne Cholesterin. Dies konnte anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen beobachtet werden. Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Annexin A2t-Domänen zeigen einen Höhenunterschied von 4.6 nm zur Cholesterin-haltigen Membranoberfläche. Da dieser Wert der auf DPPC/DPPS-Membranen bestimmten Höhe entspricht (siehe Abschnitt 4.10), inseriert das Annexin A2t offensichtlich kaum in Cholesterin-haltige POPC/POPS-Membranen. Dies verdeutlicht den festigenden Einfluß des Cholesterins auf die Membranstruktur und impliziert eine geringere laterale Diffusion der Lipide. Aufgrund der geringeren Insertion des Proteins in die Lipidschicht ist vermutlich auch die Interaktion mit den PS-Lipiden auf der Unterseite der Membran verringert. Aufgrund der geringeren Deformierbarkeit der Membran wäre, nach den diskutierten Ergebnissen, die durch das Annexin A2t induzierte laterale Organisation der Lipide verringert. Diese Verringerung der lateralen Ansammlung negativ-geladener Lipide könnte ein weiterer Grund für die Bildung tendenziell kleinerer Domänen sein, wie sie in Anwesenheit von Cholesterin in rasterkraft- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen visualisiert wurden.

Die Bildung des heterotetrameren Annexin A2t-Komplexes verändert die charakteristischen Eigenschaften des Annexin A2 wie  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität und Membranaggregationsvermögen. Bisher ist zwar bekannt, daß eine stabile Komplexbildung in Lösung erfolgt, über eine Interaktion von Annexin A2m mit p11 nach der Membranbindung ist jedoch noch wenig bekannt. Daher sollte in dieser Arbeit die Wechselwirkung zwischen membrangebundenem Annexin A2m und p11 untersucht werden. Mit Hilfe rasterkraftmikroskopischer Topographieaufnahmen konnte gezeigt werden, daß p11 nicht in der Lage ist an Annexin A2m zu binden, welches auf einer DPPC/DPPS-Oberfläche immobilisiert ist. Ein Grund hierfür könnte in der Anordnung der Annexin-Moleküle auf der Oberfläche liegen. Da die DPPS-Lipide in der Gelphase vorliegen, ist laterale Beweglichkeit des gebundenen Annexins stark eingeschränkt. Für eine erfolgreiche Komplexbildung müßten zwei Annexine zufällig in der passenden Position liegen, um eine p11-Interaktion zu ermöglichen. Zudem könnte die dichte Packung der Annexin A2m-Moleküle

eine sterische Hinderung für die p11 - Bindung bedeuten. Kastl konnte mit Hilfe von Quarzmikrowaagemessungen zeigen, daß das p11 ebenfalls nicht in der Lage ist an Annexin A2m zu binden, das an OT-POPC/POPS - Membranen adsorbiert ist<sup>[163]</sup>. Auch in diesem System kann davon ausgegangen werden, daß das Annexin in einer dichten Monolage an die Membranoberfläche gebunden ist und so sterische Gründe eine Interaktion der beiden Proteine verhindern. Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen an festkörperunterstützten POPC/POPS - Schichten auf Glimmer zeigten zwar einen geringfügigen Höhenunterschied von 0.5 nm der Annexin - Domänen vor und nach der Zugabe von p11, jedoch ist dieser geringe Höhenunterschied nicht ausreichend um eine eindeutige Bindung des p11 - Liganden an das Annexin A2m nachzuweisen. Fluoreszenzmikroskopische Analysen bieten eventuell einen guten Ansatz, um diese Fragestellung zu klären.



## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die molekulare Anordnung und die laterale Verteilung von Annexin A2t und A2m auf Membranoberflächen visualisiert und charakterisiert. An Hand topographischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Annexin A2t mit beiden Annexin-Molekülen des Proteinkomplexes an die Membran gebunden ist. Hierzu wurden mittels LB-Übertrag Lipiddoppelschichten aus 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) und 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserin (DPPS) hergestellt, an die das Annexin adsorbiert wurde. Die in der Topographie sichtbaren runden Domänen sind auf die spezifische Bindung des Annexins an DPPS-haltige Bereiche der Lipidschicht zurückzuführen und weisen einen Höhenunterschied von 4.2 nm zur Membranoberfläche auf. Ein Vergleich der Höhe von membrangebundenem Annexin A2m und A2t zeigt, daß beide Annexin-Monomere des Annexin A2t-Komplexes an die Membran gebunden sind.

Desweiteren wurde die Reversibilität der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Annexin A2m-Membranbindung mit der Quarzmikrowaage-technik untersucht. Der Adsorptions- und Desorptionsprozeß zeigt zwei Wendepunkte bei steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration, die auf die Assoziation des Proteins mit unterschiedlich affinen Bindungsstellen zurückzuführen sind. Im nanomolaren Bereich erfolgt ein kooperativer Bindungsprozeß an hoch affine Bindungsstellen, während die im mikromolaren Bereich beobachtete Interaktion mit niedrig affinen Bindungsplätzen nicht-kooperativ erfolgt. Ausgehend von einem von Ross entwickelten Modell<sup>[78]</sup> für die reversible Annexin A2t-Membranbindung konnte aus der lediglich gering ausgeprägten Hysterese zwischen Adsorptions- und Desorptionskurve des Annexin

A2m geschlossen werden, daß Annexin A2m im Gegensatz zu Annexin A2t nur geringfügig Membran-organisierende Eigenschaften besitzt.

Mit Hilfe der Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie konnte die laterale Verteilung sowohl des Annexin A2m als auch des Annexin A2t auf Lipiddoppelschichten aus 1 - Palmitoyl - 2 - Oleoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphocholin (POPC) und 1 - Palmitoyl - 2 - Oleoyl - *sn* - glycerol - 3 - phosphoserin (POPS) visualisiert werden. In den mikroskopischen Aufnahmen sind laterale Proteinaggregate unterschiedlicher Größe und Form zu erkennen, die im Fall des Monomers 8% und im Fall des Heterotetramers 11 % der Oberfläche bedecken. Die Größenverteilung der lateralen Aggregate des Annexin A2m und A2t zeigt, daß monomeres Annexin tendenziell kleinere Domänen ausbildet als Annexin A2t. Für beide Proteine ist der Höhenunterschied zur Lipidoberfläche der POPC/POPS-Membran um etwa 2.5 nm niedriger als auf den festeren DPPC/DPPE-Schichten, wodurch eine teilweise Insertion der Annexin-Moleküle in die fluide Lipidmembran nachgewiesen werden konnte. Zudem konnte gezeigt werden, daß Cholesterin die Festigkeit der POPC/POPS-Membran erhöht, worauf die Insertion des Annexins in die Lipidschicht behindert wird.

Desweiteren wurde die Wechselwirkung des Proteinliganden p11 mit membrangebundenem Annexin A2m untersucht. Aus topographischen Aufnahmen ist ersichtlich, daß p11 nicht oder nur geringfügig mit Annexin A2m interagiert, wenn dieses bereits an eine Membran gebunden ist. Dies stellt einen wichtigen Hinweis auf die regulatorische Funktion des p11 auf die Annexin-Membranrekrutierung dar.

In rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen der Annexin A2t-Aggregate auf POPC/POPS-Schichten konnte eine Verarmung an PS-reichen Lipiddomänen nachgewiesen werden. Eine durch Annexin A2t-induzierte laterale Organisation negativ-geladener PS-Lipide wurde erstmals im Rahmen dieser Arbeit visualisiert.



# Literaturverzeichnis

- [1] Crumpton, M. J. and Dedman, J. R., **1990** Protein terminology tangle. *Nature*, 345(6272), 212.
- [2] Fernandez, M. P. and Morgan, R. O., **2003** Structure, function and evolution of the annexin gene superfamily. *The Annexins*, 21–37.
- [3] Emans, N., Gorvel, J. P., Walter, C., Gerke, V., Kellner, R., Griffiths, G. and Gruenberg, J., **1993** Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J. Cell Biol.*, 120(6), 1357–1369.
- [4] Burgoyne, R. D. and Clague, M. J., **1994** Annexins in the endocytic pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(6), 231–232.
- [5] Huber, R., Römisch, J. and Paques, E., **1990** The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant calcium, membrane binding protein. *EMBO J.*, 9, 3867–3874.
- [6] Rosengarth, A., Gerke, V. and Luecke, H., **2001** X-ray structure of full-length annexin 1 and implications for membrane aggregation. *J. Mol. Biol.*, 306, 489–498.
- [7] Liemann, S., Bringemeier, I., Benz, J., Gottig, P., Hofmann, A., Huber, R., Noegel, A. A. and Jacob, U., **1997** Crystal structure of the C-terminal tetrad repeat from synexin (annexin VII) of Dictyostelium discoideum. *J. Mol. Biol.*, 270(1), 79–88.
- [8] Benz, J., Bergner, A., Hofmann, A., Demange, P., Gottig, P., Liemann, S., Huber, R. and Voges, D., **1996** The structure of recombinant human

- annexin VI in crystals and membrane-bound. *J. Mol. Biol.*, 260(5), 638–643.
- [9] Liemann, S. and Huber, R., **1997** Three-dimensional structure of annexins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 53(6), 516–521.
- [10] Liemann, S. and Lewit-Bentley, A., **1995** Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function. *Structure*, 3(3), 233–237.
- [11] Gerke, V. and Moss, S. E., **1997** Annexins and membrane dynamics. *Biochim. Biophys. Acta*, 1357(2), 129–154.
- [12] Geisow, M. J., **1986** Common domain structure of  $\text{Ca}^{2+}$  and lipid-binding proteins. *FEBS Lett.*, 203(1), 99–103.
- [13] Geisow, M. J., Fritsche, U., Hexham, J. M., Dash, B. and Johnson, T., **1986** A consensus amino-acid sequence repeat in Torpedo and mammalian  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent membrane-binding proteins. *Nature*, 320(6063), 636–638.
- [14] Raynal, P. and Pollard, H. B., **1994** Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1197, 63–93.
- [15] Brisson, A., Mosser, G. and Huber, R., **1991** Structure of soluble and membrane-bound annexin V. *J. Mol. Biol.*, 220, 199–203.
- [16] Mukhopadhyay, S. and Cho, W., **1996** Interactions of annexin V with phospholipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1279, 58–62.
- [17] Barnes, J. A. and Gomes, A. V., **2002** Proteolytic signals in the primary structure of annexins. *Mol. Cell. Biochem.*, 231(1-2), 1–7.
- [18] Powell, M. A. and Glenney, J. R., **1987** Regulation of calpactin I phospholipid binding by calpactin I light-chain binding and phosphorylation by p60v-src. *Biochem. J.*, 247(2), 321–328.

- [19] Hubaishy, I., Jones, P. G., Bjorge, J. D., Bellagamba, C., Fitzpatrick, S. L., Fujita, D. J. and Waisman, D. M., **1995** Modulation of annexin II tetramer by tyrosine phosphorylation. *Biochemistry*, 34, 14527–14534.
- [20] Bellagamba, C., Hubaishy, I., Bjorge, J. D., Fitzpatrick, S. L., Fujita, D. J. and Waisman, D. M., **1997** Tyrosine phosphorylation of annexin II tetramer is stimulated by membrane binding. *J. Biol. Chem.*, 272, 3195–3199.
- [21] Ayala-Sanmartin, J., Gouache, P. and Henry, J. P., **2000** N-Terminal domain of annexin 2 regulates  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent membrane aggregation by the core domain: a site directed mutagenesis study. *Biochemistry*, 39(49), 15190–15198.
- [22] Creutz, C. E., Zaks, W. J., Hamman, H. C., Crane, S., Martin, W. H., Gould, K. L., Oddie, K. M. and Parsons, S. J., **1987** Identification of chromaffin granule-binding proteins. Relationship of the chromobindins to callectrin, synhibin, and the tyrosine kinase substrates p35 and p36. *J. Biol. Chem.*, 262(4), 1860–1868.
- [23] Sopkova-de Oliveira Santos, J., Oling, F. K., Rety, S., Brisson, A., Smith, J. C. and Lewit-Bentley, A., **2000** S100 protein-annexin interactions: a model of the (Anx2-p11)(2) heterotetramer complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 1498(2-3), 181–191.
- [24] Lewit-Bentley, A., Rety, S., Sopkova-de Oliveira Santos, J. and Gerke, V., **2000** S100-annexin complexes: some insights from structural studies. *Cell. Biol. Int.*, 24(11), 799–802.
- [25] Waisman, D., **1995** Annexin II tetramer: structure and function. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 149/150, 301 – 322.
- [26] Drust, D. S. and Creutz, C. E., **1988** Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature*, 331(6151), 88–91.
- [27] Hayes, M. J., Rescher, U., Gerke, V. and Moss, S. E., **2004** Annexin-actin interactions. *Traffic*, 5(8), 571–576.

- [28] Harder, T. and Gerke, V., **1993** The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin IIp11(2) complex. *J. Cell Biol.*, 123(5), 1119–1132.
- [29] Puisieux, A., Ji, J. and Ozturk, M., **1996** Annexin II up-regulates cellular levels of p11 protein by a post-translational mechanisms. *Biochem. J.*, 313 ( Pt 1), 51–55.
- [30] Ayala-Sanmartin, J., Henry, J. P. and Pradel, L. A., **2001** Cholesterol regulates membrane binding and aggregation by annexin 2 at submicromolar  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *Biochim. Biophys. Acta*, 1510(1-2), 18–28.
- [31] Ayala-Sanmartin, J., **2001** Cholesterol enhances phospholipid binding and aggregation of annexins by their core domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283(1), 72–79.
- [32] Jost, M., Zeuschner, D., Seemann, J., Weber, K. and Gerke, V., **1997** Identification and characterization of a novel type of annexin-membrane interaction:  $\text{Ca}^{2+}$  is not required for the association of annexin II with early endosomes. *J. Cell Sci.*, 110(Pt 2), 221–228.
- [33] Harder, T., Kellner, R., Parton, R. G. and Gruenberg, J., **1997** Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol. Biol. Cell*, 8(3), 533–545.
- [34] Harder, T. and Simons, K., **1997** Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 9(4), 534–542.
- [35] Ross, M., Gerke, V. and Steinem, C., **2003** Membrane composition affects the reversibility of annexin A2t binding to solid supported membranes: a QCM study. *Biochemistry*, 42(10), 3131–3141.
- [36] Mayran, N., Parton, R. G. and Gruenberg, J., **2003** Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *Embo. J.*, 22(13), 3242–3253.

- [37] Babiychuk, E. B. and Draeger, A., **2000** Annexins in cell membrane dynamics.  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated association of lipid microdomains. *J. Cell. Biol.*, 150(5), 1113–1124.
- [38] Zhao, H. and Hardy, R. W., **2004** Long-chain saturated fatty acids induce annexin II translocation to detergent-resistant membranes. *Biochem. J.*, 381(Pt 2), 463–469.
- [39] Filipenko, N. R., MacLeod, T. J., Yoon, C. S. and Waisman, D. M., **2004** Annexin A2 is a novel RNA-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 279(10), 8723–8731.
- [40] Mickleburgh, I., Burtle, B., Hollas, H., Campbell, G., Chrzanowska-Lightowlers, Z., Vedeler, A. and Hesketh, J., **2005** Annexin A2 binds to the localization signal in the 3' untranslated region of c-myc mRNA. *Febs. J.*, 272(2), 413–421.
- [41] Jindal, H. K., Chaney, W. G., Anderson, C. W., Davis, R. G. and Vishwanatha, J. K., **1991** The protein-tyrosine kinase substrate, calpactin I heavy chain (p36), is part of the primer recognition protein complex that interacts with DNA polymerase alpha. *J. Biol. Chem.*, 266(8), 5169–5176.
- [42] Gerke, V. and Weber, K., **1985** Calcium-dependent conformational changes in the 36-kDa subunit of intestinal protein I related to the cellular 36-kDa target of Rous sarcoma virus tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.*, 260(3), 1688–1695.
- [43] Gerke, V. and Weber, K., **1984** Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *Embo. J.*, 3(1), 227–233.
- [44] Raynor, C. M., Wright, J. F., Waisman, D. M. and Pryzdial, E. L., **1999** Annexin II enhances cytomegalovirus binding and fusion to phospholipid membranes. *Biochemistry*, 38(16), 5089–5095.

- [45] Thiel, C., Osborn, M. and Gerke, V., **1992** The tight association of the tyrosine kinase substrate annexin II with the submembranous cytoskeleton depends on intact p11- and  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites. *J. Cell Sci.*, 103 ( Pt 3), 733–742.
- [46] Siever, D. A. and Erickson, H. P., **1997** Extracellular annexin II. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29(11), 1219–1223.
- [47] Nakata, T., Sobue, K. and Hirokawa, N., **1990** Conformational Change and Localization of Calpactin I Complex Involved in Exocytosis as Revealed by Quick-Freeze, Deep-Etch Electron Microscopy and Immunocytochemistry. *J. Cell Biol.*, 110, 13–25.
- [48] Chasserot-Golaz, S., Vitale, N., Umbrecht-Jenck, E., Knight, D., Gerke, V. and Bader, M. F., **2005** Annexin 2 Promotes the Formation of Lipid Microdomains Required for Calcium-regulated Exocytosis of Dense-Core Vesicles. *Mol. Biol. Cell*, 16(3), 1108–1119.
- [49] Gerke, V. and Moss, S. E., **2002** Annexins: From Structure to Function. *Phys. Rev.*, 82, 331–371.
- [50] Rescher, U. and Gerke, V., **2004** Annexins - unique membrane binding proteins with diverse functions. *J. Cell Sci.*, 117(Pt 13), 2631–2639.
- [51] Dufrene, Y. F., Boland, T., Schneider, J. W., Barger, W. R. and Lee, G. U., **1998** Characterization of the physical properties of model biomembranes at the nanometer scale with the atomic force microscope. *Faraday Discuss.*, 111, 79–94.
- [52] Zobiack, N., Rescher, U., Laarmann, S., Michgehl, S., Schmidt, M. A. and Gerke, V., **2002** Cell-surface attachment of pedestal-forming enteropathogenic *E. coli* induces a clustering of raft components and a recruitment of annexin 2. *J. Cell Sci.*, 115(Pt 1), 91–98.

- [53] Singh, T. K., Abonyo, B., Narasaraaju, T. A. and Liu, L., **2004** Reorganization of cytoskeleton during surfactant secretion in lung type II cells: a role of annexin II. *Cell Signal.*, 16(1), 63–70.
- [54] Benaud, C., Gentil, B. J., Assard, N., Court, M., Garin, J., Delphin, C. and Baudier, J., **2004** AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture. *J. Cell Biol.*, 164(1), 133–144.
- [55] Simons, K. and Toomre, D., **2000** Lipid Rafts and Signal Transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1(1), 31–39.
- [56] Simons, K. and Ikonen, E., **1997** Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569–572.
- [57] Zeuschner, D., Stoorvogel, W. and Gerke, V., **2001** Association of annexin 2 with recycling endosomes requires either calcium- or cholesterol-stabilized membrane domains. *Eur. J. Cell Biol.*, 80(8), 499–507.
- [58] Jacob, R., Heine, M., Eikemeyer, J., Frerker, N., Zimmer, K. P., Rescher, U., Gerke, V. and Naim, H. Y., **2004** Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 279(5), 3680–3684.
- [59] Diakonova, M., Gerke, V., Ernst, J., Liautard, J.-P., van der Vusse, G. and Griffiths, G., **1997** Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes. *J. Cell Sci.*, 110(Pt 10), 1199–1213.
- [60] Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Burkhard, F. C., Wray, S. and Draeger, A., **2002** Modulating signaling events in smooth muscle: cleavage of annexin 2 abolishes its binding to lipid rafts. *FASEB*, 16, 1177–1184.
- [61] Oliferenko, S., Paiha, K., Harder, T., Gerke, V., Schwarzler, C., Schwarz, H., Beug, H., Gunthert, U. and Huber, L. A., **1999** Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.*, 146(4), 843–854.

- [62] Hayes, M. J. and Moss, S. E., **2004** Annexins and disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 322(4), 1166–1170.
- [63] Guzman-Aranguez, A., Olmo, N., Turnay, J., Lecona, E., Perez-Ramos, P., de Silanes, I. L. and Lizarbe, M. A., **2005** Differentiation of human colon adenocarcinoma cells alters the expression and intracellular localization of annexins A1, A2, and A5. *J. Cell Biochem.*, 94(1), 178–193.
- [64] Kwon, M., Caplan, J. F., Filipenko, N. R., Choi, K. S., Fitzpatrick, S. L., Zhang, L. and Waisman, D. M., **2002** Identification of annexin II heterotetramer as a plasmin reductase. *J. Biol. Chem.*, 277(13), 10903–10911.
- [65] MacLeod, T. J., Kwon, M., Filipenko, N. R. and Waisman, D. M., **2003** Phospholipid-associated annexin A2-S100A10 heterotetramer and its subunits: characterization of the interaction with tissue plasminogen activator, plasminogen, and plasmin. *J. Biol. Chem.*, 278(28), 25577–25584.
- [66] Roda, O., Valero, M. L., Peiro, S., Andreu, D., Real, F. X. and Navarro, P., **2003** New insights into the tPA-annexin A2 interaction. Is annexin A2 CYS8 the sole requirement for this association? *J. Biol. Chem.*, 278(8), 5702–5709.
- [67] Fitzpatrick, S. L., Kassam, G., Manro, A., Braat, C. E., Louie, P. and Waisman, D. M., **2000** Fucoidan-dependent conformational changes in annexin II tetramer. *Biochemistry*, 39, 2140–2148.
- [68] Kassam, G., Le, B.-H., Choi, K.-S., Kang, H.-M., Fitzpatrick, S. L., Louie, P. and Waisman, D. M., **1998** The p11 subunit of the annexin II tetramer plays a key role in the stimulation of t-PA-dependent plasminogen activation. *Biochemistry*, 37, 16958–16966.
- [69] Ling, Q., Jacovina, A. T., Deora, A., Febbraio, M., Simantov, R., Silverstein, R. L., Hempstead, B., Mark, W. H. and Hajjar, K. A., **2004** Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *J. Clin. Invest.*, 113(1), 38–48.



- [70] Choi, K.-S., Ghuman, J., Kassam, G., Kang, H.-M., Fitzpatrick, S. L. and Waisman, D. M., **1998** Annexin II tetramer inhibits plasmin-dependent fibrinolysis. *Biochemistry*, 37, 648–655.
- [71] Diaz, V. M., Hurtado, M., Thomson, T. M., Reventos, J. and Paciucci, R., **2004** Specific interaction of tissue-type plasminogen activator (t-PA) with annexin II on the membrane of pancreatic cancer cells activates plasminogen and promotes invasion in vitro. *Gut*, 53(7), 993–1000.
- [72] Gilmore, W. S., Olwill, S., McGlynn, H. and Alexander, H. D., **2004** Annexin A2 expression during cellular differentiation in myeloid cell lines. *Biochem. Soc. Trans.*, 32(Pt 6), 1122–1123.
- [73] Knop, M., Aareskjold, E., Bode, G. and Gerke, V., **2004** Rab3D and annexin A2 play a role in regulated secretion of vWF, but not tPA, from endothelial cells. *EMBO J.*, 23(15), 2982–2992.
- [74] Huang, X. L., Pawliczak, R., Yao, X. L., Cowan, M. J., Gladwin, M. T., Walter, M. J., Holtzman, M. J., Madara, P., Logun, C. and Shelhamer, J. H., **2003** Interferon-gamma induces p11 gene and protein expression in human epithelial cells through interferon-gamma-activated sequences in the p11 promoter. *J. Biol. Chem.*, 278(11), 9298–9308.
- [75] Zhang, L., Fogg, D. K. and Waisman, D. M., **2004** RNA interference-mediated silencing of the S100A10 gene attenuates plasmin generation and invasiveness of Colo 222 colorectal cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 279(3), 2053–2062.
- [76] Zhang, J. and McCrae, K. R., **2005** Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies. *Blood*, 105(5), 1964–1969.
- [77] Ma, G., Greenwell-Wild, T., Lei, K., Jin, W., Swisher, J., Hardegen, N., Wild, C. T. and Wahl, S. M., **2004** Secretory leukocyte protease inhibitor

- binds to annexin II, a cofactor for macrophage HIV-1 infection. *J. Exp. Med.*, 200(10), 1337–1346.
- [78] Ross, M., **2003** *Quantifizierung der Interaktion von Annexin A2 mit festkörperunterstützten Lipidmembranen*. Ph.D. thesis, WWU Münster.
- [79] Langmuir, I., **1916** The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *J. Amer. Chem. Soc.*, 38, 2221–2295.
- [80] Langmuir, I., **1917** The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *J. Amer. Chem. Soc.*, 39, 1848–1906.
- [81] Möhwald, H., **1995** Phospholipid Monolayers. In Lipowsky, R. and Sackmann, E., eds., *Handbook of Biological Physics*, vol. 1, 161–203. Elsevier Science B.V.
- [82] Möhwald, H., **1990** Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 41, 441–476.
- [83] Trommeshauser, D., Krol, S., Bergelson, L. D. and Galla, H. J., **2000** The effect of lipid composition and physical state of phospholipid monolayer on the binding and incorporation of a basic amphipathic peptide from the C-terminal region of the HIV envelope protein gp41. *Chem. Phys. Lipids*, 107(1), 83–92.
- [84] Weis, R. M., **1991** Fluorescence microscopy of phospholipid monolayer phase transitions. *Chem. Phys. Lipids*, 57, 227–239.
- [85] Dietrich, C., Bagatolli, L. A., Volovyk, Z. N., Thompson, N. L., Levi, M., Jacobson, K. and Gratton, E., **2001** Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys. J.*, 80, 1417–1428.
- [86] Kaspar, M., Stadler, H., Weiß, T. and Ziegler, C., **2000** Thickness shear mode resonators ("mass-sensitive device") in bioanalysis. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366, 602–610.

- [87] Janshoff, A., Galla, H.-J. and Steinem, C., **2000** Mikrogravimetrische Sensoren in der Bioanalytik - eine Alternative zu optischen Biosensoren? *Angew. Chem.*, 112, 4164–4195.
- [88] Yun, K., Kobatake, E., Haruyama, T., Laukkanen, M. L., Keinänen, K. and Aizawa, M., **1998** Use of a quartz crystal microbalance to monitor immunoliposome–antigen interaction. *Anal. Chem.*, 70(2), 260–264.
- [89] Steinem, C., Janshoff, A., Wegener, J., Ulrich, W. P., Willenbrink, W., Sieber, M. and Galla, H. J., **1997** Impedance and shear wave resonance analysis of ligand-receptor interactions at functionalized surfaces and of cell monolayers. *Biosens Bioelectron*, 12(8), 787–808.
- [90] Muratsugu, M., Ohta, F., Miya, Y., Hosokawa, T., Kurosawa, S., Kamo, N. and Ikeda, H., **1993** Quartz crystal microbalance for the detection of microgram quantities of human serum albumin: relationship between the frequency change and the mass of protein adsorbed. *Anal. Chem.*, 65(20), 2933–2937.
- [91] Sauerbrey, G., **1959** Verwendung von Schwingquartzen zur Wägung dünner Schichten und zur Microwägung. *Z. Phys.*, 155, 206–212.
- [92] Kanazawa, K. K. and Gordon, J. G., **1985** Frequency of a quartz crystal microbalance in contact with liquid. *Anal. Chem.*, 57, 1770–1771.
- [93] Binnig, G. and Rohrer, H., **1982** Scanning tunneling microscopy. *Helv. Phys. Acta*, 55, 726–735.
- [94] Binnig, G., Quate, C. F. and Gerber, C., **1986** Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56(9), 930–933.
- [95] Engel, A., Lyubchenko, Y. and Muller, D., **1999** Atomic force microscopy: a powerful tool to observe biomolecules at work. *Trends Cell Biol.*, 9(2), 77–80.

- [96] Janshoff, A. and Steinem, C., **2001** Scanning Force Microscopy of Artificial Membranes. *ChemBioChem*, 2, 898–908.
- [97] Fritz, M., Radmacher, M., Cleveland, J., Allersma, M. W., Stewart, R. J., Giesemann, R., Janmey, P., Schmidt, C. F. and Hansma, p. K., **1995** Imaging Globular and Filamentous Proteins in Physiological Buffer Solutions with Tapping Mode Atomic Force Microscopy. *Langmuir*, 11, 3529–3535.
- [98] Masai, J., Shibata-Seki, T., Sakai, K., Murayama, H. and Sano, K., **1996** Scanning force microscopy characterization of thin lipid films on a substrate. *Thin Solid Films*, 273, 289–296.
- [99] Milhiet, P. E., Domec, C., Giocondi, M. C., Van Mau, N., Heitz, F. and Grimellec, C. L., **2001** Domain formation in models of the renal brush border membrane outer leaflet. *Biophys. J.*, 81(1), 547–555.
- [100] Krotil, H.-U., Weilandt, E., Stifter, T., Marti, O. and Hild, S., **1999** Dynamic Friction Force Measurement with the Scanning Force Microscopy. *Surface and Interface Analysis*, 27, 341–347.
- [101] Gracia, R., Tamayo, J. and San Paulo, A., **1999** Phase Contrast and Surface Energy Hysteresis in Tapping Mode Scanning Force Microscopy. *Surface and Interface Analysis*, 27, 312–316.
- [102] Rosa-Zeiser, A., Weilandt, E., Hild, S. and Marti, O., **1997** The simultaneous measurement of elastic, electrostatic and adhesive properties by scanning force microscopy: pulsed-force mode operation. *Meas. Sci. Technol.*, 8, 1333–1338.
- [103] Krotil, H.-U., Stifter, T., Waschipky, H., Weishaupt, K., Hild, S. and Marti, O., **1999** Pulsed Force Mode: a New Methode for the Investigation of Surface Properties. *Surface and Interface Analysis*, 27, 336–340.
- [104] Chi, L., Gleiche, M. and Fuchs, H., **1998** Study of Long-Range Tilt Orientation on Fatty Acid Monolayers by Dynamic Scanning Force Microscopy. *Langmuir*, 14, 875–879.

- [105] Janshoff, A., Neitzert, M., Oberdörfer, Y. and Fuchs, H., **2000** Force Spectroscopy of Molecular Systems - Single Molecule Spectroscopy of Polymers and Biomolecules. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39, 3212–3237.
- [106] Lee, G. U., Chrissey, L. A. and Colton, R. J., **1994** Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *Science*, 266(5186), 771–773.
- [107] Oberdörfer, Y., Schrot, S., Fuchs, H., Galinski, E. and Janshoff, A., **2003** Impact of compatible solutes on the mechanical properties of fibronectin: a single molecule analysis. *PhysChemChemPhys*, 5, 1876–1881.
- [108] Karrasch, S., Hegerl, R., Hoh, J. H., Baumeister, W. and Engel, A., **1994** Atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces in an aqueous environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(3), 836–838.
- [109] Tamayo, J. and Garacia, R., **1996** Deformation, Contact Time, and Phase Contrast in Tapping Mode Scanning Force Microscopy. *Langmuir*, 12(18), 4430–4435.
- [110] Ross, M., Steinem, C., Galla, H. J. and Janshoff, A., **2001** Visualization of chemical and physical properties of calcium-induced domains in DPPC/DPPS Langmuir-Blodgett layers. *Langmuir*, 17(2437-2445).
- [111] Roberts, G., **1990** *Langmuir-Blodgett Films*. Plenum Press, New York.
- [112] Sackmann, E., **1996** Supported membranes: scientific and practical applications. *Science*, 271(5245), 43–48.
- [113] Künneke, S. and Janshoff, A., **2002** Visualization of Molecular Recognition Events on Microstructured Lipid-Membrane Compartments by In Situ Scanning Force Microscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41(2), 314–317.

- [114] Glenney, J., **1986** Phospholipid-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  binding by the 36-kDa tyrosine kinase substrate (Calpactin) and its 33-kDa core. *J. Biol. Chem.*, 261, 7247–7252.
- [115] Rety, S., Sopkova, J., Renouard, M., Osterloh, D., Gerke, V., Tabaries, S., Russo-Marie, F. and Lewit-Bentley, A., **1999** The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nature Struct. Biol.*, 6, 89–95.
- [116] Creutz, C. E., **1992** The annexins and exocytosis. *Science*, 258(5084), 924–931.
- [117] Lambert, O., Gerke, V., Bader, M. F., Porte, F. and Brisson, A., **1997** Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.*, 272(1), 42–55.
- [118] Lee, D. B., Jamgotchian, N., Allen, S. G., Kan, F. W. and Hale, I. L., **2004** Annexin A2 heterotetramer: role in tight junction assembly. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 287(3), F481–491.
- [119] Janshoff, A., Ross, M., Gerke, V. and Steinem, C., **2001** Visualization of annexin I binding to calcium-induced phosphatidylserine domains. *Chem-biochem.*, 2(7-8), 587–590.
- [120] Burger, A., Berendes, R., Liemann, S., Benz, J., Hofmann, A., Gottig, P., Huber, R., Gerke, V., Thiel, C., Romisch, J. and Weber, K., **1996** The crystal structure and ion channel activity of human annexin II, a peripheral membrane protein. *J. Mol. Biol.*, 257(4), 839–847.
- [121] Potts, B. C., Smith, J., Akke, M., Macke, T. J., Okazaki, K., Hidaka, H., Case, D. A. and Chazin, W. J., **1995** The structure of calyculin reveals a novel homodimeric fold for S100  $\text{Ca}^{2+}$  binding proteins. *Nature Struct. Biol.*, 2, 790–796.

- [122] Szebenyi, D. M. E., Obendorf, S. K. and Moffat, K., **1981** Structure of vitamin D-dependent calcium-binding protein from bovine intestine. *Nature*, 294, 327–332.
- [123] Johnstone, S. A., Hubaishy, I. and Waisman, D. M., **1992** Phosphorylation of annexin II tetramer by protein kinase C inhibits aggregation of lipid vesicles by the protein. *J. Biol. Chem.*, 267, 25976–25981.
- [124] Lambert, O., Cavusoglu, N., Gally, J., Vincent, M., Rigaud, J. L., Henry, J. P. and Ayala-Sanmartin, J., **2004** Novel organization and properties of annexin 2-membrane complexes. *J. Biol. Chem.*, 279(12), 10872–10882.
- [125] Stockbridge, N., **1987** EGTA. *Comput. Biol. Med.*, 17, 299–304.
- [126] Gilmanishin, R., Creutz, C. E. and Tamm, L. K., **1994** Annexin IV reduces the rate of lateral lipid diffusion and changes the fluid phase structure of the lipid bilayer when it binds to negatively charged membranes in the presence of calcium. *Biochemistry*, 33, 8225–8232.
- [127] Junker, M. and Creutz, C. E., **1993** Endonexin (annexin IV)-mediated lateral segregation of phosphatidylglycerol in phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry*, 32(38), 9968–9974.
- [128] Schlaepfer, D. D. and Haigler, H. T., **1987** Characterization of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I. *J. Biol. Chem.*, 262, 6931–6937.
- [129] Meers, P. and Mealy, T., **1993** Relationship between annexin V tryptophan exposure, calcium, and phospholipid binding. *Biochemistry*, 32, 5411–5418.
- [130] Junker, M. and Creutz, C. E., **1994**  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent binding of endonexin (annexin IV) to membranes: analysis of the effects of membrane lipid composition and development of a predictive model for the binding interaction. *Biochemistry*, 33, 8930–8940.

- [131] Montaville, P., Neumann, J. M., Russo-Marie, F., Ochsenbein, F. and Sanson, A., **2002** A new consensus sequence for phosphatidylserine recognition by annexins. *J. Biol. Chem.*, 277(27), 24684–24693.
- [132] Blackwood, R. A. and Ernst, J. D., **1990** Characterization of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins. *Biochem. J.*, 266, 195–200.
- [133] Evans, J., T. C. and Nelsestuen, G. L., **1994** Calcium and membrane-binding properties of monomeric and multimeric annexin II. *Biochemistry*, 33(45), 13231–13238.
- [134] Grosser, M., **2003** *Vergleichende Untersuchungen der Wechselwirkungen von monomerem und tetramerem Annexin A2 mit Lipidmembranen mittels der QCM-Technik*. Zulassungsarbeit, Universität Regensburg.
- [135] Hartmann, W., Galla, H. J. and Sackmann, E., **1977** Direct evidence of charge-induced lipid domain structure in model membranes. *FEBS Lett.*, 78(2), 169–172.
- [136] Hinderliter, A. K., Huang, J. and Feigenson, G. W., **1994** Detection of Phase Separation in Fluid Phosphatidylserin/Phosphatidylcholine Mixtures. *Biophys. J.*, 67, 1906–1911.
- [137] Demel, R. A., Paltauf, F. and Hauser, H., **1987** Monolayer characteristics and thermal behavior of natural and synthetic phosphatidylserines. *Biochemistry*, 26, 8659–8665.
- [138] Silvius, J. R. and Gagn , J., **1984** Calcium-induced fusion and lateral phase separations in phosphatidylcholine-phosphatidylserine vesicles. Correlation by calorimetric and fusion measurements. *Biochemistry*, 23, 3241–3247.
- [139] Silvius, J. R., **1990** Calcium-induced phase separations and interactions of phosphatidylcholine/anionic phospholipid vesicles. Fluorescence studies using carbazole-labeled and brominated phospholipids. *Biochemistry*, 29, 2930–2938.



- [140] Tanaka, Y. and Schroit, A. J., **1986** Calcium/Phosphate-Induced Immobilization of Fluorescent Phosphatidylserine in Synthetic Bilayer Membranes: Inhibition of Lipid Transfer between Vesicles. *Biochemistry*, 25, 2141–2148.
- [141] Hui, S. W., Boni, L. T., Stewart, T. P. and Isac, T., **1983** Identification of phosphatidylserine and phosphatidylcholine in calcium-induced phase separated domains. *Biochemistry*, 22, 3511–3516.
- [142] Reviakine, i., Simon, A. and Brisson, A., **2000** Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on the morphology of mixed DPPC-DOPS supported phospholipid bilayers. *Langmuir*, 16, 1473–1477.
- [143] Huang, J., Swanson, J. E., Dibble, A. R., Hinderliter, A. K. and Feigenson, G. W., **1993** Nonideal mixing of phosphatidylserine and phosphatidylcholine in the fluid lamellar phase. *Biophys. J.*, 64(2), 413–425.
- [144] Richter, R. P., Maury, N. and Brisson, A., **2005** On the Effect of the Solid Support on the Interleaflet Distribution of Lipids in Supported Lipid Bilayers. *Langmuir*, 21, 299–304.
- [145] Feigenson, G. W., **1989** Calcium Ion Binding between Lipid Bilayers: The Four-Component System of Phosphatidylserine, Phosphatidylcholine, Calcium Chloride and Water. *Biochemistry*, 28, 1270–1278.
- [146] Ahn, N. G., Teller, D. C., Bienkowski, M. J., McMullen, B. A., Lipkin, E. W. and de Haen, C., **1988** Sedimentation equilibrium analysis of five lipocortin-related phospholipase A2 inhibitors from human placenta. Evidence against a mechanistically relevant association between enzyme and inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 263(35), 18657–18663.
- [147] Maillard, W. S., Luecke, H. and Haigler, H. T., **1997** Annexin XII forms calcium-dependent multimers in solution and on phospholipid bilayers: a chemical cross-linking study. *Biochemistry*, 36, 9045–9050.

- [148] Concha, N. O., Head, J. F., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R. and Seaton, B. A., **1992** Annexin V forms calcium-dependent trimeric units on phospholipid vesicles. *FEBS Lett.*, 314(2), 159–162.
- [149] VÚnien-Bryan, C., Lenne, P.-F., Zakri, C., Renault, A. and Brisson, A., **1998** Characterization of the growth of 2D protein crystals on a lipid monolayer by ellipsometry and rigidity measurements coupled to electron microscopy. *Biophys. J.*, 74, 2649–2657.
- [150] Reviakine, I., Bergsma-Schutter, W. and Brisson, A., **1998** Growth of protein 2-D crystals on supported planar lipid bilayers imaged in situ by AFM. *J. Struct. Biol.*, 121, 356–361.
- [151] Reviakine, I., Bergsma-Schutter, W., Morozov, A. N. and Brisson, A., **2001** Two-dimensional crystallization of annexin A5 on phospholipid bilayers and monolayers: A solid-solid phase transition between crystal forms. *Langmuir*, 17, 1680–1686.
- [152] Reviakine, I., Bergsma-Schutter, W., MazP̄res-Dubut, C., Govorukhina, N. and Brisson, A., **2000** Surface topography of the p3 and p6 annexin V crystal forms determined by atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.*, 131, 134–239.
- [153] Voges, D., Berendes, R., Burger, A., Demange, P., Baumeister, W. and Hubert, R., **1994** Three-dimensional structure of membrane-bound annexin V. A correlative electron microscopy - X-ray crystallography study. *J. Mol. Biol.*, 238, 199–213.
- [154] Pigault, C., Follenius-Wund, A., Schmutz, M., Freyssinet, J.-F. and Brisson, A., **1994** Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes. *J. Mol. Biol.*, 236, 199–208.
- [155] Hinderliter, A. K., Almeida, P. F., Biltonen, R. L. and Creutz, C. E., **1998** Membrane domain formation by calcium-dependent, lipid-binding proteins: insights from the C2 motif. *Biochim. Biophys. Acta*, 1448(2), 227–235.

- [156] Hinderliter, A. K., Biltonen, R. L. and Almeida, P. F., **2004** Lipid Modulation of Protein-Induced Membrane Domains as a Mechanism for Controlling Signal Transduction. *Biochemistry*, 43, 7102–7110.
- [157] Mbamala, E. C., Ben-Shaul, A. and May, S., **2005** Domain Formation Induced by the Adsorption of Charged Proteins on Mixed Lipid Membranes. *Biophys. J.*, 88, 1702–1714.
- [158] Schiller, P., Wahab, M. and Mogel, H. J., **2004** Forces between colloidal particles adsorbed on fluid membranes. *J. Non-Newt. Fluid Mech.*, 119, 145–153.
- [159] Weikl, T. R., **2003** Indirect interactions of membrane-adsorbed cylinders. *Eur. Phys. J. E.*, 12, 265–273.
- [160] Demange, P., Voges, D., Benz, J., Liemann, S., Gottig, P., Berendes, R., Burger, A. and Huber, R., **1994** Annexin V: the key to understanding ion selectivity and voltage regulation? *Trends Biochem. Sci.*, 19(7), 272–276.
- [161] Yaroslavov, A. A., Udalykh, O., Melik-Nubarov, N. S., Kabanov, V. A., Ermakov, Y. A., Azov, V. A. and Menger, F. M., **2001** Conventional and gemini surfactants embedded within bilayer membranes: contrasting behavior. *Chemistry*, 7(22), 4835–4843.
- [162] Kabanov, V. A. and Yaroslavov, A. A., **2002** What happens to negatively charged lipid vesicles upon interacting with polycation species? *J. Control. Release*, 78(1-3), 267–271.
- [163] Kastl, K., **2005** *Wechselwirkung von Annexin A1 mit Modellmembranen und S100A11*. Ph.D. thesis, Universität Regensburg.



# Anhang

## A1 Abkürzungsverzeichnis

AFM	Rasterkraftmikroskopie ( <i>atomic force microscopy</i> )
APS	Ammoniumperoxodisulfat
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DOPS	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoserin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DPPS	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoserin
DRM	Detergenz - resistente Membranfragmente
DTT	Dithiothreitol
E-64	trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido-(4-Guanidino)-butan
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
FPLC	Flüssigchromatographie ( <i>fast performance liquid chromatography</i> )
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
g	gasanalog
LB	Langmuir-Blodgett
$l_c$	flüssig - kondensiert ( <i>liquid condensed</i> )
$l_e$	flüssig - expandiert ( <i>liquid expanded</i> )
$l_o$	flüssig - geordnet ( <i>liquid ordered</i> )
LFM	Reibungskraftmikroskopie ( <i>lateral force microscopy</i> )
Mes	2-( <i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
OD	Optische Dichte
OT	Oktanthiol
PA	Phosphatidsäure

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PG	Phosphatidylglycerol
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
POPS	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoserin
QCM	Quarzmikrowaage
<i>s</i>	festanalog ( <i>solid</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan

## A2 Symbolverzeichnis

$F$	Kraft
$c$	Konzentration
$d$	Abstand
$f$	Frequenz
$k$	Federkonstante
$n$	Hill - Koeffizient
$t$	Zeit
$z$	Auslenkung
$\Delta$	Differenz
$\Theta$	Belegungsgrad
$\gamma$	Oberflächenspannung
$\varepsilon$	Absorptionskoeffizient
$\pi$	Oberflächendruck

## A3 Materialien

5 MHz AT-cut Quarze	KVG (Niederbischofsheim)
Cantilever CSC37	MikroMash (Tallin, Estland)
DE 52 - Material	VWR International (Darmstadt)
Dialysesschläuche VISKING Typ 27/32	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Fluoreszenzlabeling Kit TexasRed-X	Molecular Probes (Eugene, USA)
Glimmerplättchen	Plano GmbH (Wetzlar)
MonoS HR5/5	Amersham Biosciences (Freiburg)
Polycarbonatmembran	Avestin (Ottawa, Kanada)
Quarzküvetten	Hellma GmbH (Mühlheim)
SephacrylS-200-HR	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

## A4 Geräte

### Filmwaagetechnik

Filmlift	Riegler & Kirstein (Mainz)
Wilhelmy-Filmwaage	Riegler & Kirstein (Mainz)

### Fluoreszenzmikroskopie

CCD - Kamera	Carl Zeiss (Göttingen)
Axiocam MRm	
Filterset45	Carl Zeiss (Göttingen)
(BP 560/40, FT 585, BP 630/75)	
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss (Göttingen)

### Quarzmikrowaagetechnik

Frequenzzähler	Hewlett-Packard (San Diego, USA)
Oszillatorschaltkreis	Texas Instruments (Dallas, USA)
TTL SN74LS124N	

Peristaltikpumpe Reglo Digital

Ismatec (Wertheim-Mondfeld)

### **Rasterkraftmikroskopie**

NanoWizard

JPK Instruments (Berlin)

### **Reinstwasseranlage**

MilliQ plus 185

Millipore (Eschborn)

Milli RO 3 plus

Millipore (Eschborn)

### **Sonstiges**

Gelelektrophorese-Apparatur

LFT Labortechnik (Wasserburg)

Thermo EC120

Spannungsquelle Consort E844

LiposofastTexasRed Miniextruder

Avestin (Ottawa, Kanada)

pH-Meter Calmatic 766

Knick (Berlin)

Trans-BlotTexasRed SB

Biorad (Hercules, USA)

Ultraschallbad Sonorex

Bandelin (Berlin)



# Danksagung

An dieser Stelle gilt mein ganz besonderer Dank

- Frau Prof. Dr. Claudia Steinem für die Bereitstellung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit sowie die stete Diskussionsbereitschaft.
- Prof. Dr. Volker Gerke von der WWU Münster für die Möglichkeit, die Annexin - Isolierung in seinem Arbeitskreis durchführen zu können.
- Prof. Dr. Andreas Janshoff von der Universität Mainz für die hilfreichen Diskussionen und vor allem seinem Mitarbeiter Simon Faiss für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen an den mikrostrukturierten Membranen.
- Katja Kastl für die Hilfe bei der Durchführung der QCM-Messungen und diverse gemeinsam durchstandene Nächte bei den Proteinpräps.
- der Feinmechanik- und Elektronikwerkstatt, deren steter Gast ich war.
- bei allen Arbeitskreismitgliedern: meiner Laborkollegin Natascha, die jeder Zeit ein offenes Ohr für mich hatte, dem Sunshine-Lab: Alex und Claudia, Barbara, Anja, Eva, Bernie und den Ehemaligen Winni, Katja, Linda, Melli und Barbara für das tolle Arbeitsklima, die stete Hilfsbereitschaft und nicht zu vergessen die abendlichen "Messungen".
- den "Buschis" Edith, Hendrik, Stephan und Ralf für die fachliche Hilfsbereitschaft, aber vor allem für eine tolle Zeit in Regensburg.
- natürlich meinen Eltern, die mich jederzeit unterstützt und mir so einiges erleichtert haben.

Und ganz besonders bei meinem Freund Christian, der all meine Launen ertragen hat (was wahrlich nicht immer einfach ist).

DANKE!



# Lebenslauf

<b>Name</b>	Manuela Menke
<b>geboren</b>	19.06.1977 in Georgsmarienhütte
<b>Schulbildung</b>	08/1983 - 06/1987 Michaelisgrundschule, Georgsmarienhütte 07/1987 - 08/1989 Orientierungsstufe Oesede 08/1989 - 06/1996 Gymnasium Oesede
<b>Studium</b>	10/1996 - 09/2001 Studium der Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster <u>20.10.1998 Vordiplom im Fach Chemie</u> 04/2000 - 10/2000 Auslandsstudium an der University of California, Santa Barbara 04/2001 - 09/2001 Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Uni Münster unter Anleitung von Prof. Dr. C. Steinem <u>28.09.2001 Diplom im Fach Chemie</u>
<b>Tätigkeiten</b>	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Uni Regensburg unter der Anleitung von Prof. Dr. C. Steinem
<b>Förderungen</b>	Mitglied des Graduiertenkollegs GRK 760 „Medizinische Chemie: Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft von 04/2002 bis 05/2005 Stipendiatin des Graduiertenkollegs von 06/2004 bis 05/2005
<b>Dissertation</b>	Beginn der Dissertation am 1.11.2001 am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Uni Regensburg unter der Anleitung von Prof. Dr. C. Steinem

## Publikationen und Poster

### Publikationen

Menke, M., Künneke, S. and Janshoff, A. **2002** Lateral organization of GM1 in phase-separated monolayers visualized by scanning force microscopy. *Eur. Biophys. J.*, 31, 317-322

Menke, M., Ross, M., Gerke, V. and Steinem, C. **2004** The molecular arrangement of membrane-bound annexin A2-S100A10 tetramer as revealed by scanning force microscopy. *Chembiochem.*, 5, 1003-1006

### Posterpräsentationen

AFM imaging of rafts in model membranes  
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik/NanoBio Tec, September 2001, Münster

Interaction of Annexin A2/S100 heterotetramer with phospholipid membranes  
Summer School „Medicinal Chemistry“, September 2002, Regensburg

Membrane composition influences the reversibility of annexin A2t binding to artificial membrane systems  
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, September 2002, Dresden

Membrane microdomain formation in artificial membrane systems  
Workshop „Membrane Microdomains“, August 2004, Regensburg

Membrane binding and organisation of annexin A2  
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, September 2004, Freiburg